



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**TERAPÊUTICA GENÉTICA APLICADA À FIBROSE CÍSTICA**

Trabalho submetido por

**Carolina Alexandra Chumbinho Farrajota Ralheta**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**novembro de 2018**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**TERAPÊUTICA GENÉTICA APLICADA À FIBROSE CÍSTICA**

Trabalho submetido por

**Carolina Alexandra Chumbinho Farrajota Ralheta**

para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro**

**novembro de 2018**



## **Agradecimentos**

O percurso nestes últimos cinco anos não foi fácil, e não teria sido possível sem a presença das pessoas que conheci neste instituto, que me acompanharam sempre desde o início, e levo comigo no meu coração para onde quer que a vida me encaminhe. Obrigada a vocês, Sofia Novais, Carlota Matos, Estela Fragoso, Sara Guiomar, Cátia Caetano e Raquel Gomes, por tornarem esta montanha russa cheia de boas emoções e recordações para a vida.

Aos meus pais, devo-lhes todo o apoio que me têm dado ao longo da vida e, apesar de tudo, todo o esforço e dedicação para que pudesse disfrutar da oportunidade que tive de poder seguir este caminho.

Ao meu namorado, são inúmeras as palavras que poderia utilizar para agradecer todo o apoio que me tem dado ao longo destes cinco anos, e por ter acreditado em mim desde o primeiro dia.

À minha irmã, agradeço o exemplo que me deu, que me fez seguir em frente e tirar este curso, e especialmente por ter sido a minha companheira dos bons e maus momentos, desde o primeiro dia que cheguei a Lisboa.

Por fim, resta-me agradecer à minha orientadora, Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, por ter sido uma excelente professora desde a primeira cadeira que nos lecionou, Biologia Celular, por nos aturar sempre com a sua boa disposição e principalmente pela sua disponibilidade, sabedoria e simpatia.



## Resumo

A FC é uma doença genética, autossômica recessiva, que resulta de uma mutação no gene CFTR. As alterações que ocorrem na proteína CFTR, resultantes desta mutação, são responsáveis por diversas manifestações clínicas, como insuficiência pancreática e, a nível respiratório, inflamações e infecções crônicas.

Atualmente, a terapêutica desta doença ainda passa muito pela resolução dos sintomas e correção de disfunções orgânicas. O principal objetivo das *guidelines* é retardar a progressão dos problemas pulmonares, sendo que são os mais comuns, com a prevenção e controlo da função e infeção respiratória.

Entretanto, foram desenvolvidos e aprovados medicamentos moduladores da doença (ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor e ataluren) que têm como principal alvo a proteína CFTR truncada, e as suas respetivas consequências.

Contudo, nos últimos 20 anos, apesar das diversas barreiras com que se têm deparado as investigações, a FC tem sido o centro das atenções no âmbito da terapia genética pois, devido às suas características, a correção de apenas um dos alelos é suficiente para reverter a doença.

Por fim, até aos dias de hoje, alguns ensaios têm sido realizados de modo a comprovar tanto a segurança como a eficácia das inúmeras técnicas de terapia genética existentes. A segurança é uma característica presente em muitos desses estudos, no entanto, os resultados de eficácia ficaram aquém do que era esperado, e por isso são necessárias novas investigações para serem alcançados novos e melhores resultados.

No futuro acredita-se que vai ser possível desenvolver mais e melhores opções terapêuticas, de modo a alcançar uma cura para doenças como a FC. A esperança cai sobre o recente desenvolvimento da técnica de edição genética CRISPR/Cas9, pois abriu novas portas no âmbito da terapia genética aplicada à FC.

**Palavras-chave:** Fibrose Cística; Terapia Genética; Mutações CFTR; Gene CFTR

### *Abstract*

CF is a genetic disease with an autosomal recessive inheritance, that comes from a mutation on the gene CFTR. CFTR protein suffers alterations as a consequence of this mutation. These changes are manifested clinically, mostly as pancreatic insufficiency and chronic respiratory inflammations or infections.

Nowadays, the therapy of this disease is mostly based on symptomatic treatment and correction of organic dysfunctions. The main complication is pulmonary pathology and so the main goal of guidelines is to delay the progression of lung involvement by preventing respiratory infection and controlling lung function.

Recently new pharmacological therapy has been developed and approved. This modulatory medication (ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor e atalureno) has as a target the CFTR protein, preventing the activity of this faulty protein.

Nonetheless, in the last 20 years CF has been the major focus of genetic therapy because even with correction of just one of the alleles it is enough to revert the disease, and even with the many difficulties that the investigations have faced the studies carry on.

Until today, many clinical trials have been performed as a way to prove the degree of safeness and efficiency of the many existent genetic therapies. In the many studies that were done, safeness was indeed proven, but the results did not determined a reassuring result where efficiency is concerned. And so, more new research is needed for improvement of the results.

It is believed that in the future the development of more and better therapeutic options will move towards the cure of diseases like CF. Hope is falling over the most recent technique of genetic manipulation of CRISPR/Cas9, and that it will open new doors on the subject of CF genetic therapy.

**Key-Words:** Cystic Fibrosis; Genetic Therapy; CFTR Mutations; CFTR Gene



## Índice Geral

Índice de Figuras .....	5
Lista de Abreviaturas.....	8
Capítulo I - Introdução .....	11
Capítulo II - Fibrose Cística .....	13
1 - Epidemiologia .....	13
2 - Diagnóstico .....	15
2.1 - Manifestações Clínicas.....	15
2.2 - Rastreio Neonatal .....	17
2.3 - História Familiar .....	18
3 - Proteína CFTR .....	21
4 - Mutações CFTR .....	23
4.1 - Classe I.....	23
4.2 - Classe II.....	24
4.3 - Classe III .....	24
4.4 - Classe IV .....	25
4.5 - Classe V .....	25
4.6 - Classe VI.....	26
Capítulo III - Terapêutica Aplicada à Fibrose Cística.....	27
1 - Terapêutica Convencional – <i>Guidelines</i> .....	27
2 - Terapêutica Baseada Nas Mutações Genéticas .....	28
2.1 - Ivacaftor (Kalydeco®) .....	29
2.2 - Lumacaftor + Ivacaftor (Orkambi®).....	30
2.3 - Atalureno (Translarna®) .....	32
2.4 - Tezacaftor + Ivacaftor (Symdeko®) .....	33
3 - Terapêutica Genética.....	34
3.1 - Sistemas Vetoriais.....	36

3.1.1 – Sistemas Vetoriais Virais.....	36
3.1.1 a) - Adenovírus .....	37
3.1.1 b) - Vírus Adeno-associados.....	40
3.1.1 c) - Retrovírus .....	42
3.1.1 d) - Lentivírus .....	43
3.1.1 e) - Vírus Herpes-Simplex tipo 1.....	46
3.1.2 - Sistemas Vetoriais Não Virais .....	49
3.1.2 a) - Lipoplexos.....	50
3.1.2 b) - Poliplexos.....	51
3.2 – Edição Genética.....	53
3.2.1 – ZFN.....	54
3.2.2 – TALEN .....	55
3.2.3 – CRISPR/Cas9 .....	56
3.3 - Barreiras à Terapêutica Genética .....	58
3.3.1 – Processo de Captação, Transporte e Desencapsidação do Vetor.....	59
3.3.2 – Persistência do Genoma do Vetor .....	60
3.3.3 – Atividade de Transcrição.....	60
3.3.4 – Resposta Imune do Organismo do Hospedeiro .....	60
3.4 – Evidências Científicas .....	61
3.4.1 – Vetores VAA .....	61
3.4.2 – Vetores Lipoplexos.....	63
3.4.3 – Técnicas de Edição Genética com Base em CRISPR/Cas9 .....	64
3.4.4 – Técnicas de Edição Genética com Base em ZFN.....	64
Capítulo IV - Conclusão .....	67
Capítulo V - Bibliografia.....	69

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Localização do gene CFTR (adaptado de Lister Hill National Center for Biomedical Communications, 2018).	13
<b>Figura 2:</b> Prevalência mundial de FC à nascença (adaptado de CFTR Science, 2017). Número de nados vivos por caso de FC.	14
<b>Figura 3:</b> Prevalência de FC à nascença, em Portugal (adaptado de CFTR Science, 2017). Número de nados vivos por caso de FC.	14
<b>Figura 4:</b> Manifestações clínicas da FC nos órgãos afetados pela proteína disfuncional ou ausente (adaptado de Paranjape & Mogayzel, 2014).	17
<b>Figura 5:</b> Hereditariedade autossómica recessiva, no caso de dois progenitores portadores da mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).	19
<b>Figura 6:</b> Hereditariedade autossómica recessiva, no caso de um progenitor saudável (RR) e outro portador de uma mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).	19
<b>Figura 7:</b> Hereditariedade autossómica recessiva, no caso de um progenitor ser afetado pela FC (rr) e outro saudável (RR) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).	20
<b>Figura 8:</b> Hereditariedade autossómica recessiva, no caso de um portador afetado pela FC (rr) e outro portador da mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).	20
<b>Figura 9:</b> Hereditariedade autossómica recessiva, no caso de ambos os progenitores afetados pela FC (rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).	21
<b>Figura 10:</b> Representação da estrutura da proteína CFTR (adaptado de Vankeerberghen et al., 2002).	21
<b>Figura 11:</b> Mecanismo de abertura do canal CFTR (adaptado de Vankeerberghen et al., 2002).	22
<b>Figura 12:</b> Classificação das mutações CFTR e respetivo defeito provocado na produção da proteína CFTR (adaptado de Witt, 2003).	23
<b>Figura 13:</b> Mecanismo de ação do lumacaftor/ivacaftor (Orkambi®) (adaptado de Vertex,	

2018b).....	31
<b>Figura 14:</b> Mecanismo de ação do atalureno (Translarna®) (adaptado de Zainal Abidin et al., 2017).....	33
<b>Figura 15:</b> Mecanismo de ação do tezacaftor/ivacaftor (Symdeko®) (Vertex, 2018c). 33	
<b>Figura 16:</b> Modificação de um vírus num vetor viral. <b>a)</b> Diagrama esquemático de um vírus. <b>b)</b> Formação do vetor viral. Na construção do acondicionamento dá-se a junção da informação genética viral que codifica para as proteínas estruturais e para as proteínas necessárias à replicação do ADN com o genoma vetor. (adaptado de Thomas et al., 2003) .....	37
<b>Figura 17:</b> Organização genómica do adenovírus e respetivos vetores possíveis (adaptado de Volpers & Kochanek, 2004).....	39
<b>Figura 18:</b> Organização genómica do Vírus Adeno-associado <i>wild-type</i> (adaptado de Carvalho, 2010). .....	40
<b>Figura 19:</b> Representação esquemática da produção de vetores VAA. <b>A)</b> Representação dos plasmídeos utilizados na produção do vetor VAA. <b>B)</b> Processo de transfeção em célula 293 para produção do vetor VAA. (adaptado de Carvalho, 2010) .....	41
<b>Figura 20:</b> Representação esquemática de um exemplo de um vetor retroviral (adaptado de Balajthy et al., 2011).....	43
<b>Figura 21:</b> Representação esquemática do genoma do lentivírus (VIH) (adaptado de University of Cincinnati, 2014).....	44
<b>Figura 22:</b> Organização genómica do lentivírus e respetivos vetores (adaptado de University of Cincinnati, 2014). .....	45
<b>Figura 23:</b> Estrutura do VHS-1. <b>A)</b> Representação esquemática do genoma do VHS-1. Localização espacial da região longa e curta ( $U_L$ e $U_S$ ) do vírus, e respetivos genes essenciais e acessórios. <b>B)</b> Regulação do ciclo de vida do vírus. <b>C)</b> Representação esquemática de um vetor VHS-1 (adaptado de Robbins & Ghivizzani, 1998). .....	47
<b>Figura 24:</b> Processo de transfeção e endocitose mediada por lipoplexos. Produção de lipoplexos: lipossomas compostos por lípidos catiónicos complexados com ADN. Transfeção e endocitose: Os lipoplexos interagem com os proteoglicanos e fundem com a membrana celular, dando-se a endocitose; durante a maturação do endossoma em lisossoma, pode dar-se a lise do endossoma e o ADN presente no seu interior liberta-se	

no citoplasma e potencialmente seguirá para o núcleo onde poderá ser iniciada a sua expressão; entretanto, alguns fragmentos de ADN podem sofrer degradação juntamente com o lisossoma (adaptado de Parker, Newman, Briggs, Seymour, & Sheridan, 2003).

..... 51

**Figura 25:** Representação esquemática da formação de um políplexo ADN-Quitossano de Baixo Peso Molecular (QBPM) e passos do processo de transfeção (adaptado de Agirre et al., 2014). .... 53

**Figura 26:** Ilustração de um conjunto de *fingers* (FokI) ligados ao ADN e respetivo processo de clivagem e reparação genética por recombinação homóloga ou junção final não homóloga. Os domínios *binding* estão representados pelas sequências coloridas (vermelho, azul e verde). Os domínios cleavage estão representados pelos retângulos com sombreado amarelo (adaptado de Carroll, 2011). .... 55

**Figura 27:** Representação esquemática de dois TALENs, separados pelo *spacer* de 15-20 pb onde ocorre a dimerização dos domínios FokI (adaptado de Simone et al., 2018). .... 56

**Figura 28:** Mecanismo de edição genética através do sistema CRISPR/Cas9 (adaptado de Agrotis & Ketteler, 2015). .... 57

**Figura 29:** Barreiras ao sucesso da terapia genética: A) processo de captação, transporte e desencapsidação; B) persistência do genoma do vetor; C) atividade de transcrição; e D) resposta imune do organismo do hospedeiro (adaptado de Kay, 2011). .... 59

## Lista de Abreviaturas

- ABC** – *ATP-binding cassette*, cassete de ligação para a trifosfato de adenosina
- Ad** – Adenovírus
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico
- ADNc** – Ácido Desoxirribonucleico complementar
- ARN** – Ácido Ribonucleico
- ARNg** – Ácido Ribonucleico *guide*
- ARNm** – Ácido Ribonucleico mensageiro
- ARNt** – Ácido Ribonucleico Transportador
- ATG** – Agentes de Transferência Genética
- ATP** – *Adenosine Triphosphate*, Trifosfato de Adenosina
- Br<sup>-</sup>** – Ião brometo
- cAMP** – 3'-5' Adenosina Monofosfato Cíclica
- CFTR** – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística
- Cl<sup>-</sup>** - Ião Cloreto
- CRISPR/Cas9** - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated to Cas9 nucleases*
- CsCl** – Cloreto de Césio
- CTP** – Codões de Terminação Prematuros
- DNA** – *Deoxyribonucleic Acid*
- DGS** – Direção Geral de Saúde
- DNase** - Desoxirribonuclease
- DR** – Domínio Regulador
- DSB** – *Double-Strand Break*
- EMA** – *European Medicines Agency*
- ENaC** – *Epithelial Sodium Channel*, Canal de Sódio Epitelial
- F<sup>-</sup>** – Ião Fluoreto
- FC** – Fibrose Cística
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FEV<sub>1</sub>** – Volume Expiratório Forçado em 1 segundo
- GP** – Genes Precoces
- I<sup>-</sup>** – Ião Iodeto

**IRT** – *Immunoreactive Tripsyn*, Tripsina Imunorreativa

**ITR** – *Inverted Terminal Repeats*, Repetições Terminais Invertidas

**LTR** – *Long Terminal Repeat*

**Lv** – Lentivírus

**NBD** – *Nucleotide Biding Domain*, Domínio de Ligação de Nucleótidos

**PAM** - *Protospacer Adjacent Motif*

**Pb** – Pares de Bases

**PBS** – *Primer Binding Site*

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PEI** - Polietilenoimina

**PKA** – Proteína Cinase A

**PKC** – Proteína Cinase C

**PLL** – Polilisina

**PNV** – Plano Nacional de Vacinação

**PPT** – Trato de Polipurina

**RVD** – *Repeat Variable Diresidue*

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TALE** – *Transcription Activator-Like Effectors*

**TALEN** – *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

**TMD** – *Transmembrane Domain*, Domínio Transmembranar

**TR** – *Terminal Repeat*

**U2SO** – Células Epiteliais do Osteossarcoma Humano

**VAA** – Vírus Adeno-Associados

**VAIE** – Vírus da Anemia Infeciosa Equina

**VHS-1** – Vírus Herpes-*Simplex* tipo 1

**VIF** – Vírus da Imunodeficiência Felina

**VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**ZFN** – *Zinc-Finger Nucleases*

**ZFN-CFTR** – *Zinc Finger Nucleases* específicas para CFTR





## Capítulo I - Introdução

Nos seres humanos, as alterações genéticas que ocorrem à nascença, ou até durante a vida do adulto, podem provocar diversos problemas de saúde, ou doenças. Estas alterações resultam da perda, substituição ou duplicação da informação genética (ANFQ, 2012).

A terapêutica genética é entendida como um tratamento, ou tentativa de tratamento, de doenças genéticas, através da introdução de cópias de determinados genes em células específicas. Pode ser concretizada pela substituição de genes defeituosos, adição de genes que possam ajudar no tratamento, ou até mesmo pela desativação do gene que causa o problema (US Department of Health & Human Services, 2018).

A fibrose cística (FC) é uma doença genética, crónica e de hereditariedade autossómica recessiva, causada por mutações no braço longo do cromossoma 7, no *locus* do gene que codifica a proteína reguladora da condutância transmembranar da FC (CFTR). Esta proteína é expressa, em diversas células epiteliais, como um canal iónico de Cl<sup>-</sup>. A FC está associada à disfunção das glândulas exócrinas, é principalmente caracterizada por secreções anómalas (secreção de muco mais espesso devido ao aumento de cloreto no suor) e pode afetar os pulmões, o aparelho digestivo, as glândulas sudoríparas e o aparelho génito-urinário (Dalcin & Silva, 2008).

Atualmente, o tratamento e o seguimento da FC passam maioritariamente pelo tratamento sintomático e pela correção das disfunções orgânicas. Sendo que a principal causa de morbilidade e mortalidade desta doença é o envolvimento pulmonar, as *guidelines* atuais incidem-se principalmente na prevenção e controlo de infeções e doenças respiratórias (NICE, 2017).

A FC tem sido o principal foco das investigações em terapia genética nos últimos anos (Paul-Smith, Bell, Alton, Alton, & Griesenbach, 2016). Recentemente, são utilizados moduladores CFTR nas investigações, e desenvolvidos outros novos, com o objetivo de restaurar a função da proteína CFTR. Através da inserção de ácido desoxirribonucleico complementar (ADNc), com a ajuda de diferentes vetores, no genoma epitelial, pode compensar-se a produção deficiente de proteína CFTR eficaz (Hubert et al., 2016).

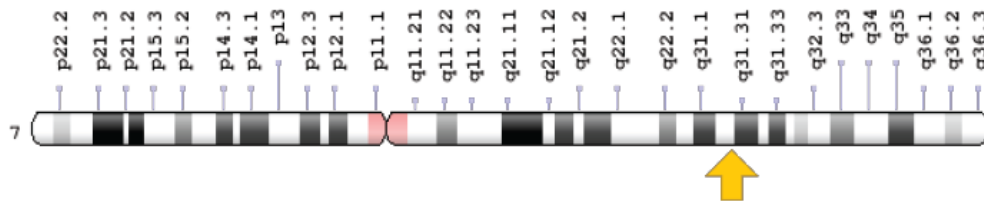
No entanto, os moduladores CFTR ainda têm uma atividade limitada, e são necessárias mais investigações de modo a descobrir novos e mais potentes moduladores.

Felizmente, encontramos-nos numa nova era de medicina genómica, e espera-se que nos próximos tempos sejam realizadas grandes descobertas e melhorias relacionadas com o tratamento da FC (Fajac & De Boeck, 2016).

O presente trabalho resulta de uma intensa e variada consulta bibliográfica em motores de pesquisa como o PubMed, a B-on e o Google Scholar, com datas de publicação compreendidas entre 1996 e 2018. Neste, serão abordados diversos tópicos, como as características da FC, as mutações CFTR e consequentes alterações provocadas na proteína. Para além disso, este trabalho focar-se-á na terapêutica aplicada à FC, tanto a terapêutica convencional (*guidelines* atuais), como moduladores da doença, e principalmente a terapia genética (por sistemas vetoriais e técnicas de edição genética). Por fim, será abordado o estado atual das investigações de terapêutica genética aplicada à FC e as perspetivas futuras.

## Capítulo II - Fibrose Cística

A FC é uma doença genética crônica, de hereditariedade autossômica recessiva, que resulta de uma mutação no gene que codifica a proteína CFTR, que se localiza no braço longo do cromossoma 7, banda 31.2 (Rowntree & Harris, 2003) (figura 1).



**Figura 1:** Localização do gene CFTR (adaptado de Lister Hill National Center for Biomedical Communications, 2018).

Mutações neste gene, podem causar vários distúrbios devido a alterações geradas na síntese, transporte e atividade da proteína CFTR. Esta proteína é um canal de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), que facilita o transporte de fluídos e hidratação das células epiteliais de vários órgãos (pulmão, intestino, pâncreas, etc) (Molinski et al., 2018).

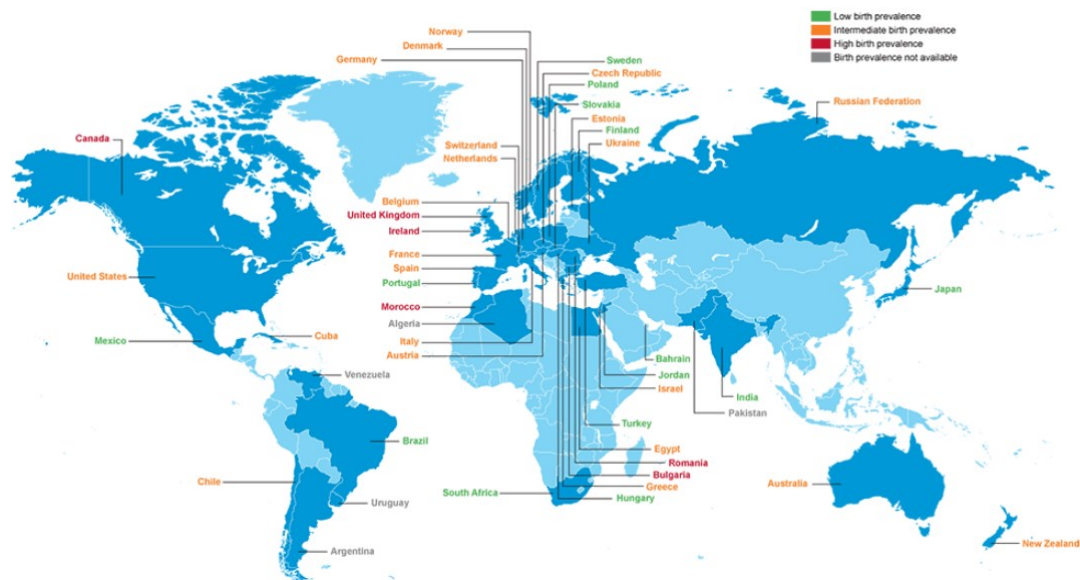
As alterações que ocorrem no gene CFTR são responsáveis por diversos transtornos. O aumento da atividade da proteína CFTR resulta no aumento do transporte de  $\text{Cl}^-$  para o exterior das células, responsável por manifestações suaves da FC (Castellani & Assael, 2016). No entanto, a ausência da proteína ou a diminuição da sua atividade, que resulta em desidratação e produção de secreções viscosas, pode conduzir a um fenótipo mais grave da doença tendo como consequência inflamação e infecção dos diversos órgãos envolvidos (Molinski et al., 2018).

Devido ao papel ativo que a proteína CFTR desempenha nos órgãos, a expressividade desta está então relacionada com a amplitude da expressão da doença e a eventual morte do seu portador (Castellani & Assael, 2016).

### 1 - Epidemiologia

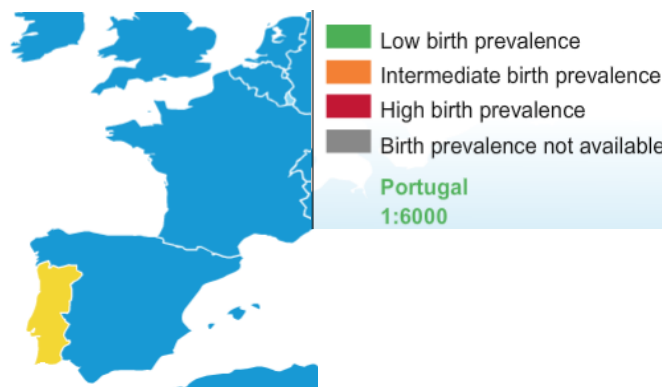
A FC é uma doença autossômica recessiva que afeta cerca de 70000 indivíduos a nível mundial, sendo este grupo constituído principalmente por indivíduos caucasianos (Espadinha, 2010).

Numa perspetiva mundial, as zonas geográficas com maior prevalência de FC são a América do Norte, Europa, Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e ilhas do Oceano Pacífico. No entanto, esta doença pode afetar também outras populações, de diferentes etnias ou raças, como a africana, latino-americana e populações do médio oriente (figura 2) (CFTR Science, 2017).



**Figura 2:** Prevalência mundial de FC à nascença (adaptado de CFTR Science, 2017). Número de nados vivos por caso de FC.

Em Portugal, 1 em cada 6000 recém-nascidos tem a doença, o que corresponde a uma baixa prevalência de FC à nascença (figura 3) (CFTR Science, 2017).



**Figura 3:** Prevalência de FC à nascença, em Portugal (adaptado de CFTR Science, 2017). Número de nados vivos por caso de FC.

Atualmente, as populações têm sido caracterizadas consoante as mutações do gene CFTR, e estas são detetadas em cerca de 95% dos portadores da doença. Na Europa a mutação F508del é a mais comum (tal como a nível mundial), com uma frequência de cerca de 70%, no entanto, outras mutações como a Gly542X, Asn1303Lys e Gly551Asp também são possíveis de encontrar, e correspondem 10-15% de todas as mutações do gene CFTR que causam a doença (WHO, 2002).

## **2 - Diagnóstico**

A FC é diagnosticada principalmente em crianças com menos de 3 anos, no entanto, cerca de 10% dos casos são diagnosticados acima dos 18 anos de idade (Espadinha, 2010).

Em 1959 o desenvolvimento do teste do suor veio facilitar o diagnóstico desta doença. Este teste mede a concentração de  $Cl^-$  no suor, que em indivíduos portadores da doença geralmente está elevada. Hoje em dia ainda é um método muito utilizado, embora falível, pois é um teste que pode apresentar resultados erróneos (falsos-negativos e falsos-positivos) (Paranjape & Mogayzel, 2014).

Em 1989, com a clonagem do gene CFTR, começou a considerar-se as características genéticas da doença, sendo que este é um teste muito mais sensível e específico (Espadinha, 2010).

Atualmente, o diagnóstico da FC é realizado tendo em conta três critérios: existência de uma ou mais manifestações clínicas, presença de história familiar e rastreio neonatal positivo (DGS, 2012).

### **2.1 - Manifestações Clínicas**

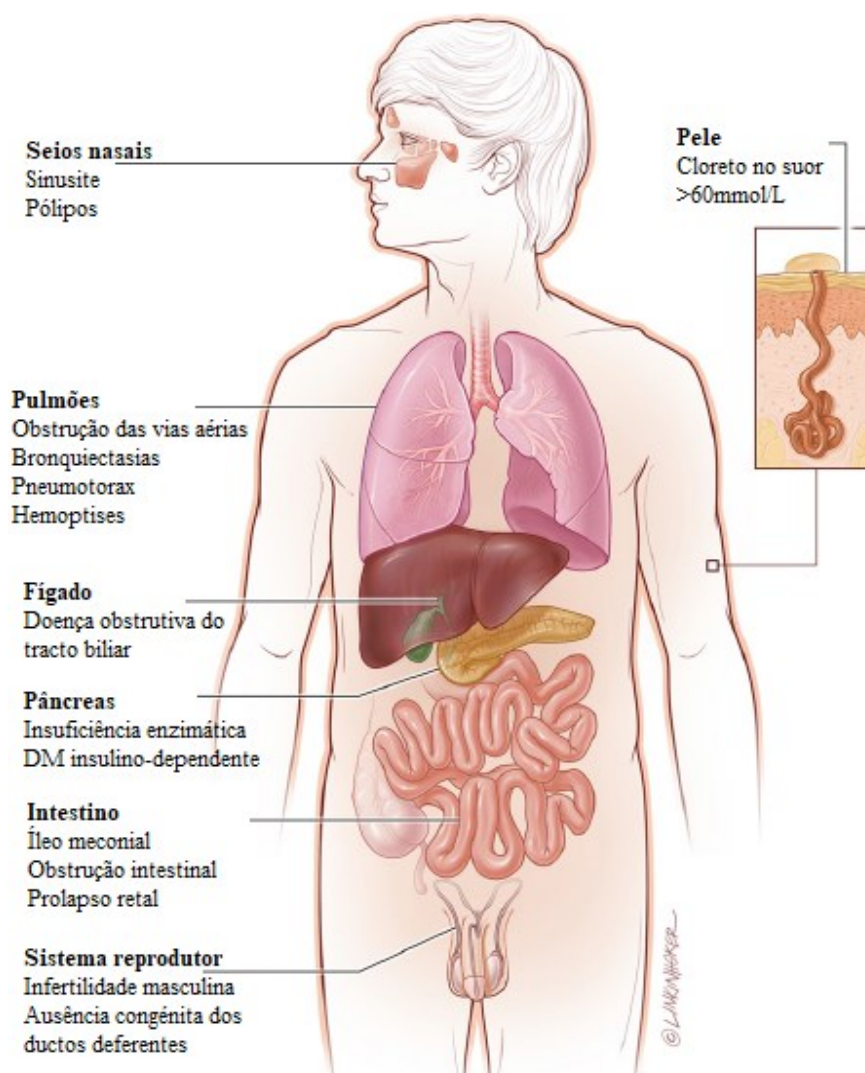
As características fenotípicas da FC geralmente variam de forma interindividual, até mesmo em doentes portadores de uma mesma mutação, pois a relação genótipo-expressão é influenciada por diversos fatores (Rowntree & Harris, 2003).

De um modo geral, os sintomas gastrointestinais devem-se maioritariamente à insuficiência pancreática (característica da FC) que é responsável por esteatorreia e má absorção dos açúcares e nutrientes, e torna difícil a manutenção do peso do doente (Gelfond & Borowitz, 2013).

A maior causa de morbidade e mortalidade em doentes com FC são as manifestações clínicas que ocorrem a nível respiratório (Lund-Palau et al., 2016). Infecções crónicas e inflamação das vias respiratórias são características desta doença e é frequente verificarem-se infeções pulmonares persistentes, tosse com expectoração crónica, bronquiectasias, atelectasias, infiltrados e h perinsufla  o pulmonar, obstrução das vias, pólipos nasais e ainda hipocratismo digital, que normalmente vem associado a doenças pulmonares (Dalcin & Silva, 2008).

A FC é uma doença que afeta diversos órgãos e por isso é responsável por uma enorme variedade de comorbilidades, como síndromes de perda de sal, diabetes, cálculos biliares, colangiectasias, sinusite cr nica, doenças ósseas e infertilidade (figura 4) (Paranjape & Mogayzel, 2014).

Contudo, a ausência de sintomas, por si só, não permite a exclusão do diagnóstico de FC, uma vez que dentro de uma família pode não significar a ausência da doença, devido à heterogeneidade clínica da mesma (Rowntree & Harris, 2003).



**Figura 4:** Manifestações clínicas da FC nos órgãos afetados pela proteína disfuncional ou ausente (adaptado de Paranjape & Mogayzel, 2014).

## 2.2 - Rastreio Neonatal

Os rastreios são realizados para identificar doenças específicas em indivíduos que apresentam elevada probabilidade de as ter. Estes têm como fim maximizar o diagnóstico e minimizar as manifestações clínicas (Castellani et al., 2009).

O rastreio neonatal tem como principal objetivo a cedência antecipada de cuidados a crianças diagnosticadas com FC. O diagnóstico e tratamento precoce pode promover o crescimento, manter os pulmões saudáveis, aumentar a esperança de vida e, consequentemente, reduzir os internamentos hospitalares (Cystic Fibrosis Foundation, s.d.).

Nos primeiros dias de vida do recém-nascido, são recolhidas amostras de sangue (com uma picada no calcanhar) para se proceder à determinação de tripsina imunorreativa (IRT) através do teste de Guthrie. A fiabilidade e validade dos métodos de rastreio são de considerar, por isso, após ser obtido um resultado positivo para FC, é realizado o teste do suor de forma a confirmar o diagnóstico (Cystic Fibrosis Foundation, s.d.).

A determinação de IRT é muito utilizada no rastreio neonatal de FC. Indivíduos com obstrução dos ductos pancreáticos (típico na FC) não segregam tripsinogénio, o que não permite que haja ativação deste em tripsina e promove a sua acumulação no sangue, detetável neste método (Teixeira, 2007).

Atualmente, apesar de ser possível a identificação das mutações do gene CFTR, o teste do suor ainda se mantém como *standard* para o diagnóstico de FC (Castellani et al., 2009).

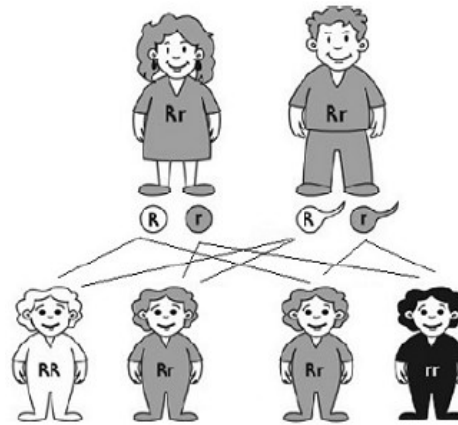
Em suma, mesmo que não sejam visíveis características clínicas da doença, recém-nascidos que apresentem o rastreio neonatal positivo e elevada concentração de Cl<sup>-</sup> no suor são diagnosticados com FC (Castellani et al., 2009).

### **2.3 - História Familiar**

A existência de antecedentes familiares, relativamente à FC, aumenta a probabilidade de hereditariedade do gene mutado. Esta é uma doença genética, com um padrão autossómico recessivo, que implica que as mutações responsáveis pela doença tenham de ser identificadas em ambos os alelos do gene CFTR proveniente dos progenitores, ou seja, nas famílias em que a FC está presente, a doença só é herdada à criança se ambos os genes CFTR mutados lhe forem transmitidos pelos progenitores. (Cystic Fibrosis News Today, s.d.).

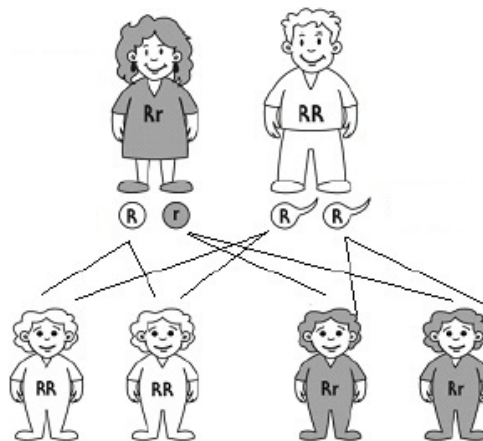
Se ambos os progenitores forem portadores da mesma mutação em apenas um dos alelos do gene CFTR (heterozigóticos), os filhos desse casal terão 25% de probabilidade de receber duas cópias do gene mutado (afetados pela doença), 25% de probabilidade de receber duas cópias do gene normal (não sendo afetados pela doença, nem portadores da mutação) e 50% de probabilidade de receber uma cópia do gene mutado e uma do gene normal (não sendo afetados pela doença, mas sim portadores da mutação) (figura 5) (Centre for Genetics Education, 2018).





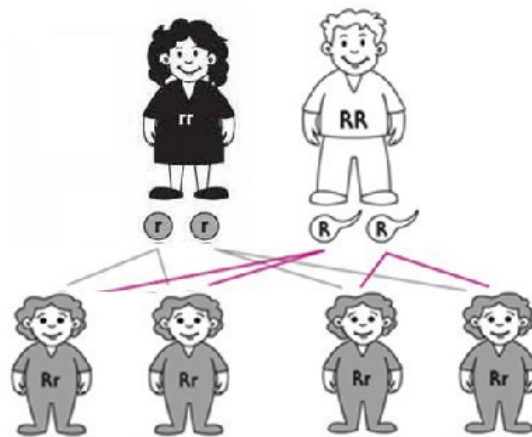
**Figura 5:** Hereditariedade autossômica recessiva, no caso de dois progenitores portadores da mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).

Quando um progenitor não é portador de nenhuma mutação, e o outro é portador de uma mutação num dos alelos, o filho que nascer terá 50% de probabilidade de ser 100% saudável e 50% de probabilidade de ser portador da mutação num dos alelos (figura 6) (Centre for Genetics Education, 2018).



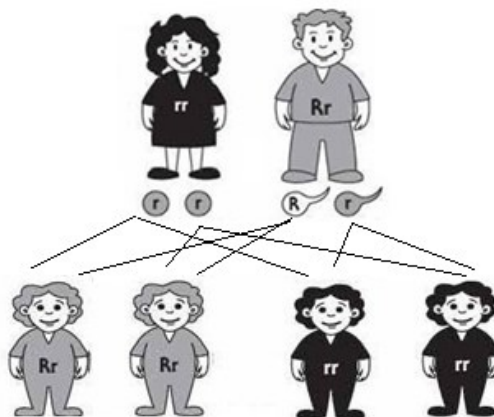
**Figura 6:** Hereditariedade autossômica recessiva, no caso de um progenitor saudável (RR) e outro portador de uma mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).

Ainda, se um dos progenitores é afetado por FC e outro é saudável, é certo que os filhos serão portadores da mutação em apenas um dos alelos (todos heterozigóticos) (figura 7) (Centre for Genetics Education, 2018).



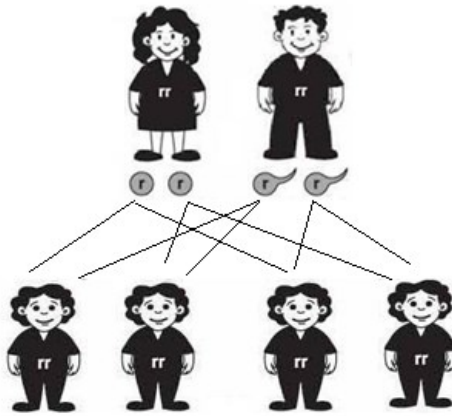
**Figura 7:** Hereditariedade autossômica recessiva, no caso de um progenitor ser afetado pela FC (rr) e outro saudável (RR) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).

No caso de um dos progenitores ser afetado pela doença e outro ser apenas portador da mutação num dos alelos, a probabilidade de o filho ser portador é de 50%, e de ser afetado pela doença é também de 50% (figura 8) (Centre for Genetics Education, 2018).



**Figura 8:** Hereditariedade autossômica recessiva, no caso de um portador afetado pela FC (rr) e outro portador da mutação num dos alelos (Rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018).

E por fim, se ambos os progenitores forem indivíduos afetados pela FC, é certo que todos os seus filhos serão também afetados pela doença (figura 9) (Centre for Genetics Education, 2018).



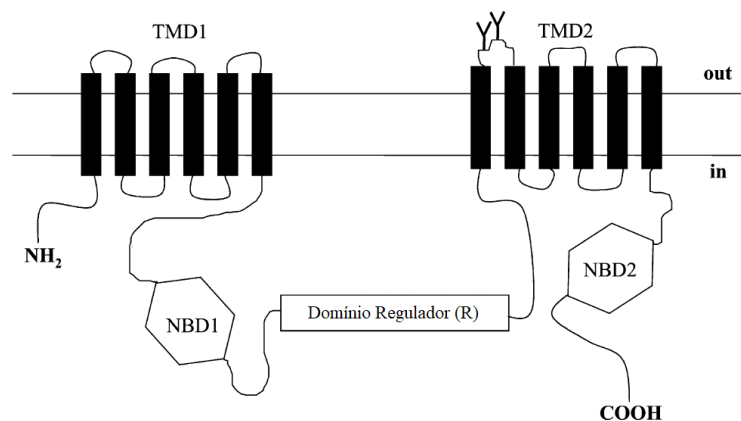
**Figura 9:** Hereditariedade autossômica recessiva, no caso de ambos os progenitores afetados pela FC (rr) (adaptado de Centre for Genetics Education, 2018)

### 3 - Proteína CFTR

A proteína CFTR é composta por 1480 aminoácidos e apresenta uma estrutura simétrica. Esta sequência de aminoácidos é característica da família dos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), bombas de trifosfato de adenosina (ATP) (Vankeerberghen, Cuppens, & Cassiman, 2002).

Esta proteína é composta por duas unidades repetidas, que constituem dois domínios transmembranares (TMD). Ambos os TMD integram seis hélices transmembranares hidrofóbicas e um domínio de ligação de nucleótidos (NBD), que interage diretamente com a ATP (figura 10) (Noel, Schmidt, Haaf, & Leal, 2016).

Os TMD1 e TMD2 estão interligados através de um domínio regulador (DR), que contém sequências consenso para a fosforilação da proteína cinase A (PKA) e C (PKC). O DR é característico apenas da proteína CFTR, o que lhe confere exclusividade e a difere dos restantes transportadores ABC (Noel et al., 2016).



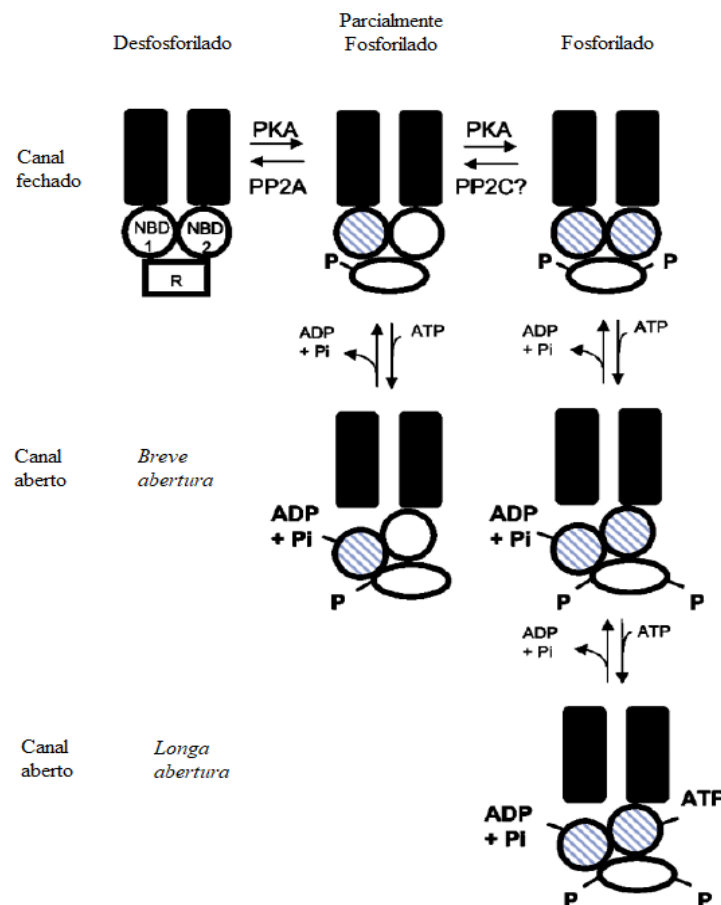
**Figura 10:** Representação da estrutura da proteína CFTR (adaptado de Vankeerberghen et al., 2002).

A proteína CFTR funciona principalmente como um canal de  $\text{Cl}^-$ , no entanto seletivo também para outros aniões, como o brometo, iodeto e fluoreto ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  e  $\text{F}^-$ ). A ativação deste canal é realizada pela 3'-5' adenosina monofosfato cíclica (cAMP).

O poro do canal é da responsabilidade dos TMD e a abertura/fecho do mesmo é coordenado pela fosforilação do DR pela PKA, e pela interação dos ATPs com os NBDs (figura 11) (Vankeerberghen et al., 2002).

A PKA fosforila o DR, que permite a ligação de ambos os NBDs aos ATPs, e resulta na abertura do canal. Depois, os ATPs são hidrolisados e os produtos resultantes desta hidrólise são libertados por ambos os NBDs, o que provoca o fecho do canal. No entanto, todo este processo de abertura é possível enquanto o DR estiver fosforilado, quando se dá a desfosforilação do DR, pelas fosfatases, é necessária nova fosforilação pela PKA para se iniciar novamente ao processo de abertura do canal de  $\text{Cl}^-$ .

Ainda assim, outras funções são desempenhadas pela proteína, para além do transporte de aniões, como o transporte de bicarbonato ou a interação com outros canais, como o canal de sódio epitelial (ENaC) (Rowntree & Harris, 2003).

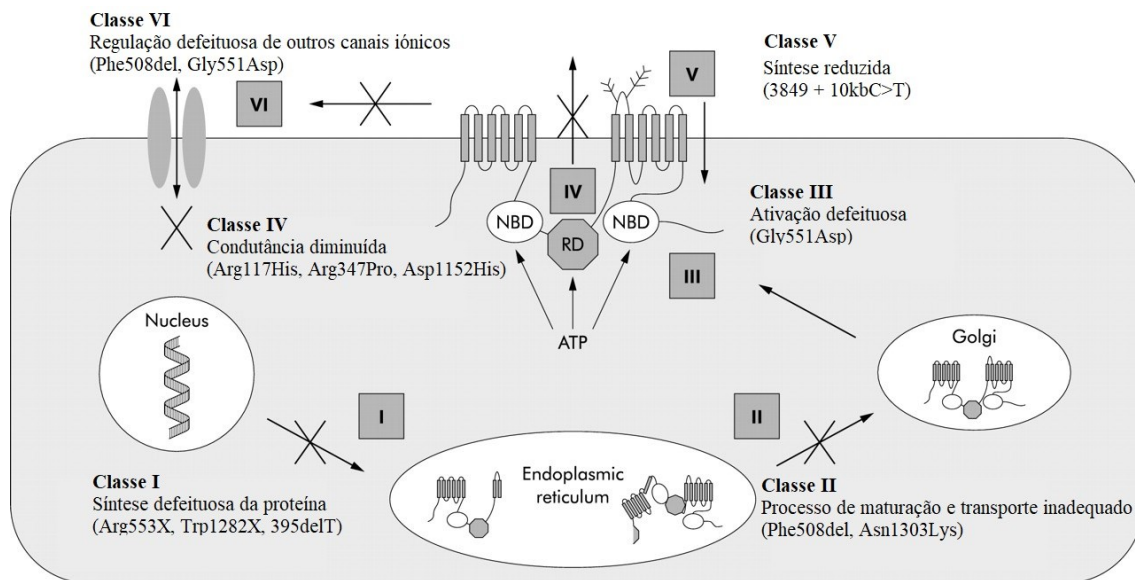


**Figura 11:** Mecanismo de abertura do canal CFTR (adaptado de Vankeerberghen et al., 2002).

## 4 - Mutações CFTR

Até hoje, foram identificadas mais de 2000 mutações, sendo que a maioria são consideradas raras (Molinski et al., 2018). Estima-se que cerca de 70% dos doentes com fibrose cística são portadores da mutação Phe508del, e que os portadores das mutações Gly542X, Asn1303Lys, Gly551Asp e Trp1282X, embora não tão comuns, representam frequências acima de 1% (Rowntree & Harris, 2003).

As mutações CFTR são agrupadas em 6 classes diferentes, sendo a classificação realizada consoante os defeitos provocados (na síntese, estrutura e função da proteína), o tipo de mutação e o local onde ocorre (figura 12) (Elborn, 2016).



**Figura 12:** Classificação das mutações CFTR e respetivo defeito provocado na produção da proteína CFTR (adaptado de Witt, 2003).

### 4.1 - Classe I

Nas *protein production mutations* (classe I) enquadram-se as mutações *nonsense*, *frameshift* e de edição de ácido ribonucleico (ARN). As mutações *nonsense* originam um codão de terminação prematuro que bloqueia antecipadamente a tradução do gene CFTR. As mutações *frameshift* e de edição de ARN, geralmente dão origem a uma proteína truncada (Cabello, 2011).

As proteínas originárias deste processo geralmente encontram-se truncadas e não funcionais, por isso são facilmente degradadas e eliminadas das células e, como consequência, poucas ou nenhuma proteínas CFTR conseguem alcançar a membrana plasmática (Espadinha, 2010; Wang, Wrennall, Cai, Li, & Sheppard, 2014).

A classe I é conhecida por causar os danos mais graves no fenótipo da doença (Rowntree & Harris, 2003). Como representado na figura 12, Gly542X, Trp1282X e 395delT, são exemplos de mutações pertencentes a esta classe.

#### 4.2 - Classe II

As *protein processing mutations* (classe II) dizem respeito a mutações *missense*, obtidas por deleção de aminoácidos, que estão relacionadas com um processo inadequado de maturação das proteínas CFTR, e pode resultar na degradação prematura da mesma (Fajac & De Boeck, 2016).

A mutação Phe508del é a mais conhecida mundialmente nos casos de FC, e pertence a esta classe (Castellani & Assael, 2016). Estas mutações localizam-se no NBD1 e dão origem a um polipéptido truncado. No decorrer do processo, a falha é reconhecida pelo mecanismo de controlo do retículo endoplasmático e assinalada pela ubiquitina, resultando na degradação do polipéptido, pela proteossoma (Wang et al., 2014). Ainda assim, há uma pequena porção de proteínas que apresentam atividade residual e conseguem chegar à superfície celular, conferindo um fenótipo mais suave (Gallati, 2003).

#### 4.3 - Classe III

Na classe III, *gating mutations*, estão também incluídas mutações *missense*, obtidas por alteração do aminoácido codificado pelo codão mutado. Relacionada a este tipo de mutações está uma falha na resposta do canal de Cl<sup>-</sup> à sua estimulação, que resulta numa disfunção da regulação do mesmo (Cabello, 2011). Normalmente, destas mutações resulta um canal que se encontra fechado, pois é afetada a abertura do mesmo pela inibição da ligação do ATP ao NBD e pela ausência da hidrólise do mesmo (Gallati, 2003). Gly551Asp é um exemplo de mutação que está presente nesta classe, como representado na figura 12.

Normalmente, relacionadas com as mutações referidas anteriormente (pertencentes às classes I, II e III) estão algumas manifestações respiratórias e digestivas precoces, como tosse crónica, infeções pulmonares e insuficiência pancreática exócrina (Paranjape & Mogayzel, 2014).

#### 4.4 - Classe IV

As *conduction mutations* (classe IV), como Arg117His, Arg347Pro e Asp1152His, provocam a diminuição da condutância do canal de Cl<sup>-</sup> (Rowntree & Harris, 2003). Nesta classe enquadram-se mutações semelhantes às da classe III (*missense* com alteração do aminoácido que é codificado no codão mutado), no entanto diferem no efeito que têm na proteína (Cabello, 2011).

A alteração do aminoácido ocorre no local do gene que codifica para o TMD (responsável pelo poro do canal), e resulta numa modificação do fluxo de Cl<sup>-</sup>, enquanto o processo de regulação se encontra normalizado (fosforilação do DR e ligação do ATP aos NBDs), ao contrário das mutações de classe III (Becq, Mall, Sheppard, Conese, & Zegarra-Moran, 2011).

#### 4.5 - Classe V

As *insufficient protein mutations* (classe V) compreendem mutações *missense* que são responsáveis pela redução da síntese da proteína CFTR, resultante de um *splicing* defeituoso (3849+10kbC>T) ou de mutações que geram promotores que limitam a transcrição do gene CFTR (Becq et al., 2011). Consequentemente, estas mutações conduzem a uma diminuição da quantidade de proteína na superfície celular (Wang et al., 2014).

Doenças pulmonares com início suave, ou tardio, e suficiência pancreática exócrina, geralmente estão associadas a mutações pertencentes às classes IV e V (Paranjape & Mogayzel, 2014).

#### 4.6 - Classe VI

Por fim, à classe VI pertencem mutações *nonsense* e *frameshift* (Gln1412X, 4326delTC, 4279insA e 4271delC) que são responsáveis pela falta de cerca de 70-100 resíduos de aminoácidos no terminal-C do gene CFTR. O terminal-C não é um requisito importante para um canal de Cl<sup>-</sup> funcional, no entanto, é indispensável para a estabilidade da proteína CFTR glicosilada (Rowntree & Harris, 2003).

Posto isto, estas mutações originam anormalidades no terminal-C que, por sua vez, são causadoras da instabilidade da proteína CFTR truncada e, consequentemente, de um *turnover* proteico precoce e acelerado, à superfície celular (Wang et al., 2014).



## Capítulo III - Terapêutica Aplicada à Fibrose Cística

### 1 - Terapêutica Convencional – *Guidelines*

A FC é uma doença que, apesar da evolução do conhecimento a seu respeito nos últimos tempos, o tratamento ainda se resume principalmente à resolução dos sintomas e à correção de disfunções orgânicas (Dalcin & Silva, 2008).

Nos doentes com FC, o envolvimento pulmonar é comum e normalmente é o fator limitante desta doença. Por isso, o principal objetivo da terapêutica sugerida pelas *guidelines* da direção geral de saúde (DGS) é retardar a progressão dos problemas pulmonares com a prevenção e controlo da função e infeção respiratória (Teixeira, 2007).

Em primeiro lugar é importante avaliar os doentes a respeito do cumprimento do plano nacional de vacinação (PNV). No entanto, para além do PNV, devem ser prescritas, como esquema de vacinação complementar, a vacina antivaricela, a imunoglobulina antivaricela (no caso de doentes em contacto com a doença e sem história prévia de varicela), a vacina antigripal anual (a partir dos 6 meses de idade, em doentes e conviventes), a vacina pneumocócica conjugada 13-valente seguida da polissacárida 23-valente (se serologia negativa para *pneumococcus*) e ainda a vacina anti hepatite A (DGS, 2015).

A drenagem das secreções brônquicas é outro passo imprescindível no tratamento dos doentes com FC. A cinesiterapia respiratória, desde a confirmação do diagnóstico, é indispensável neste processo, no entanto, deve ser sempre acompanhada de agentes mucolíticos, de modo a diminuir a viscosidade das secreções e facilitar o processo de drenagem, como a dronase alfa recombinante, o soro salino em nebulização ou a N-acetilcisteína por via oral (DeWeerd, 2016; DGS, 2015).

Normalmente também é utilizada terapêutica broncodilatadora (salbutamol, salmeterol, aminofilina e teofilina), como profilaxia ou tratamento de broncospasmos. Por outro lado, devido ao seu efeito expensor das vias aéreas, os broncodilatadores são igualmente utilizados para facilitar a administração de outros medicamentos que são direcionados aos pulmões (DeWeerd, 2016; DGS, 2015).

Devido ao muco espesso presente nas vias aéreas dos doentes com FC, estes estão mais propícios a infeções respiratórias. Há diversas opções possíveis de antibioterapia para atingir os objetivos, tanto de prevenção como de tratamento dessas infeções, no en-

tanto, as classes de antibióticos utilizadas nestes doentes variam consoante o microrganismo isolado, as características e a gravidade do quadro clínico (DGS, 2015; Teixeira, 2007).

Nos casos de insuficiência pancreática, as enzimas produzidas pelo organismo não chegam ao sistema digestivo, por isso são prescritas enzimas pancreáticas (pancreatina) associadas a vitaminas lipossolúveis, de modo a ajudar na digestão da comida e melhorar a absorção de nutrientes (DeWeerd, 2016; DGS, 2015).

Por fim, ainda se recorre a oxigenoterapia de longa duração em situações mais graves, como quando  $PaO_2$  está abaixo dos 55 mmHg ou quando está entre 55 e 60 mmHg na presença de *cor pulmonale* crónico ou hipertensão pulmonar e/ou poliglobulia (hematócrito acima dos 55%) (DGS, 2015).

## 2 - Terapêutica Baseada Nas Mutações Genéticas

A FC é uma doença genética, hereditária, causada por mutações no gene CFTR que codifica um canal iónico responsável pelo transporte de sais e fluídos, em diversos órgãos (Davis, Yasothan, & Kirkpatrick, 2012).

Pacientes portadores desta doença geralmente recebem a terapêutica *standard*, recomendada pelas *guidelines*, que tem como objetivo tratar a sintomatologia, de modo a prolongar a vida e melhorar a qualidade da vida do doente. Ainda assim, mantém-se a necessidade de uma terapêutica mais eficaz e direcionada ao defeito genético responsável pela doença (Condren & Bradshaw, 2013).

Nas doenças monogénicas a finalidade terapêutica é a correção do distúrbio causado pelas mutações (Ginn, Amaya, Abedi, Alexander, & Edelstein, 2018). Por isso, têm sido desenvolvidos novos medicamentos a fim de se retificarem as alterações que ocorrem na proteína CFTR, devido às mutações, em doentes com FC (Carter & McKone, 2016).

Em 2012, foi aprovado o ivacaftor, o primeiro fármaco modulador a ser comercializado, que tem como alvo a proteína CFTR truncada e suas respetivas consequências (Davis et al., 2012).

## 2.1 - Ivacaftor (Kalydeco®)

O ivacaftor tem como objetivo terapêutico corrigir o defeito resultante das *gating mutations* da classe III, ou Arg117His da classe IV, que ocorrem no gene CFTR (Condren & Bradshaw, 2013; Davies et al., 2016).

As *gating mutations* da classe III originam proteínas CFTR defeituosas em que a abertura do canal está comprometida, o que não permite um transporte normal do íon  $\text{Cl}^-$ . No entanto, as mutações Arg117His da classe IV resultam não só em proteínas CFTR com a abertura do canal comprometida, mas também com a sua estrutura interna mais estreita do que a da proteína normal (Vertex, 2018a).

O ivacaftor é classificado como uma molécula pequena, potenciadora da função da proteína CFTR. O seu mecanismo de ação não está totalmente clarificado. Pensa-se que se liga diretamente à proteína, aumentando a probabilidade de abertura do canal iónico (Hubert et al., 2016), que consequentemente normaliza o transporte de  $\text{Cl}^-$  e diminui a viscosidade das secreções e os sintomas da doença (European Medicines Agency, 2015).

Em 2012, foi aprovado como terapêutica bem tolerada, segura e eficaz para o tratamento de pacientes com idade igual ou superior a 6 anos, que tenham presente pelo menos uma *gating mutation* no gene CFTR, sendo a mais comum a Gly551Asp que está presente em cerca de 5% dos doentes com FC (Davis et al., 2012; Fajac & De Boeck, 2016).

Com o ivacaftor consegue-se atingir cerca de 40% da atividade normal da proteína CFTR (Fajac & De Boeck, 2016) e diversos estudos comprovaram melhorias no peso e na função pulmonar dos doentes medicados com esta terapêutica (Carter & McKone, 2016).

Relativamente à função pulmonar, foi demonstrado pelos ensaios clínicos de fase III que o volume expiratório forçado em 1 segundo ( $\text{FEV}_1$ ) pode sofrer um aumento de 4 a 12%, após 2 semanas de tratamento com este medicamento, o que corresponde a uma melhoria significativa (Barry, Donaldson, & Jones, 2018). Além disso, foi também comprovada a diminuição do risco de exacerbações pulmonares em 55% após 48 semanas de tratamento (Barry et al., 2018).

Este medicamento não só consegue uma redução da concentração de  $\text{Cl}^-$  no suor (muitas vezes abaixo do valor limite utilizado no diagnóstico da doença) que traduz uma melhoria da função da proteína CFTR nas glândulas sudoríparas, como também consequentemente promove o aumento do peso do doente entre 1,8 a 3,7 kg (Barry et al., 2018).

Todas as melhorias clínicas demonstradas pelos ensaios clínicos confirmaram-se na vida real após a introdução deste medicamento no mercado, por isso, o tratamento precoce com ivacaftor, se bem tolerado a longo prazo, é capaz de preservar a função pulmonar, aumentando assim a esperança de vida do doente com FC (Fajac & De Boeck, 2016).

Ainda assim, um regime terapêutico com ivacaftor em monoterapia apenas é suficiente para melhorar a função pulmonar, e diminuir o  $\text{Cl}^-$  no suor, de doentes que sejam portadores de mutações da classe III ou IV, visto que tem como fim a resolução dos problemas que somente envolvem a abertura do canal iónico (Carter & Mckone, 2016).

## 2.2 - Lumacaftor + Ivacaftor (Orkambi®)

A mutação mais conhecida por provocar a FC pertence à classe II, e é a Phe508del (Carter & Mckone, 2016). Na presença de mutações da classe II, o processo de transporte intracelular da proteína CFTR encontra-se alterado. Geralmente, nestas situações, é produzida uma proteína truncada que é eliminada pela própria célula e não consegue alcançar a superfície celular (Hubert et al., 2016).

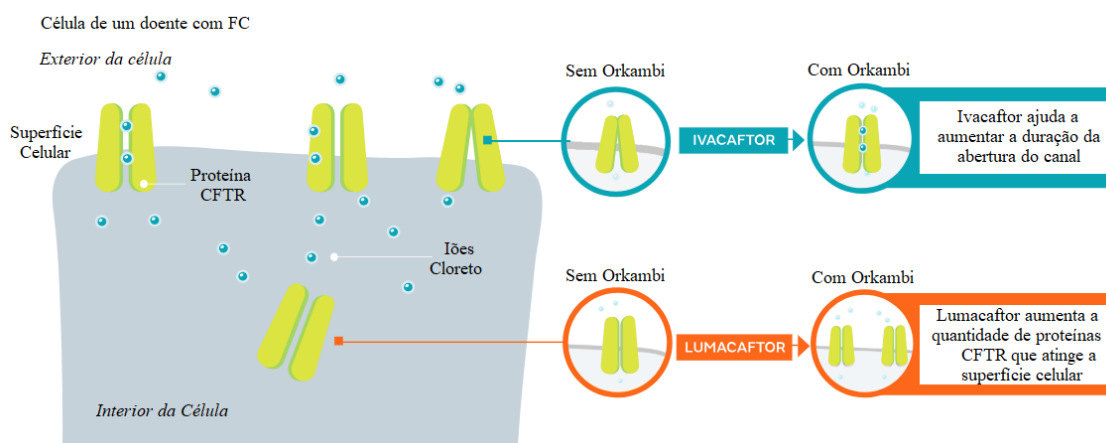
As mutações da classe II comprometem maioritariamente o processo de *folding* da proteína CFTR. No entanto, estas mutações podem também apresentar características da classe III (anormal abertura do canal iónico) e da classe VI (*turnover* proteico acelerado na superfície celular) (Carter & Mckone, 2016).

Atualmente existem fármacos corretores que são conhecidos por permitir uma maior expressão das proteínas CFTR na superfície celular, como o lumacaftor (Hubert et al., 2016). Este foi desenvolvido com o propósito de atuar na biogénese da proteína, através da interação direta com o TMD1, e suprimir os defeitos resultantes do processo de *folding*, recuperando assim a estabilidade estrutural da proteína (Fajac & De Boeck, 2016).

O lumacaftor foi classificado como o melhor corretor, tanto relativamente ao processo de *folding* da proteína, como ao transporte de Cl<sup>-</sup> (Carter & Mckone, 2016). Contudo, este fármaco utilizado em regime de monoterapia também não demonstrou trazer benefícios aos doentes com FC, portadores destas mutações (Hubert et al., 2016).

Posto isto, em 2015 foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) e pela European Medicines Agency (EMA) a utilização da combinação ivacaftor/lumacaftor (Orkambi®) em doentes homozigóticos para a mutação Phe508del, com idade superior ou igual a 12 anos (European Medicines Agency, 2017).

Assim, os mecanismos do ivacaftor e do lumacaftor complementam-se. O ivacaftor melhora a atividade da proteína aumentando a probabilidade de abertura do canal iónico de Cl<sup>-</sup>, contornando os defeitos provocados pelas mutações da classe III, e o lumacaftor consegue que um maior número de proteínas alcance a superfície celular, corrigindo as anormalidades resultantes das mutações de classe II e VI (figura 13) (Vertex, 2018b).



**Figura 13:** Mecanismo de ação do lumacaftor/ivacaftor (Orkambi®) (adaptado de Vertex, 2018b).

Vários estudos demonstraram que em doentes submetidos a tratamento com lumacaftor/ivacaftor, o FEV<sub>1</sub> aumentou 2,6% e o risco de exacerbações pulmonares que requerem internamento ou terapêutica com antibióticos sofreu uma redução de 39%, comparativamente a doentes que não fazem terapêutica nenhuma (Hubert et al., 2016).

A combinação lumacaftor/ivacaftor comprovou a sua eficácia, e a EMA considera que os benefícios desta terapêutica são superiores aos riscos, apesar de não corresponderem às expectativas de um medicamento que tem como alvo o próprio meca-

nismo da doença (European Medicines Agency, 2017).

No entanto, visto que os doentes portadores da mutação Phe508del não têm mais nenhuma alternativa terapêutica, e o fenótipo da doença resultante desta é severo, os benefícios são considerados clinicamente significativos (European Medicines Agency, 2017).

### 2.3 - Atalureno (*Translarna*®)

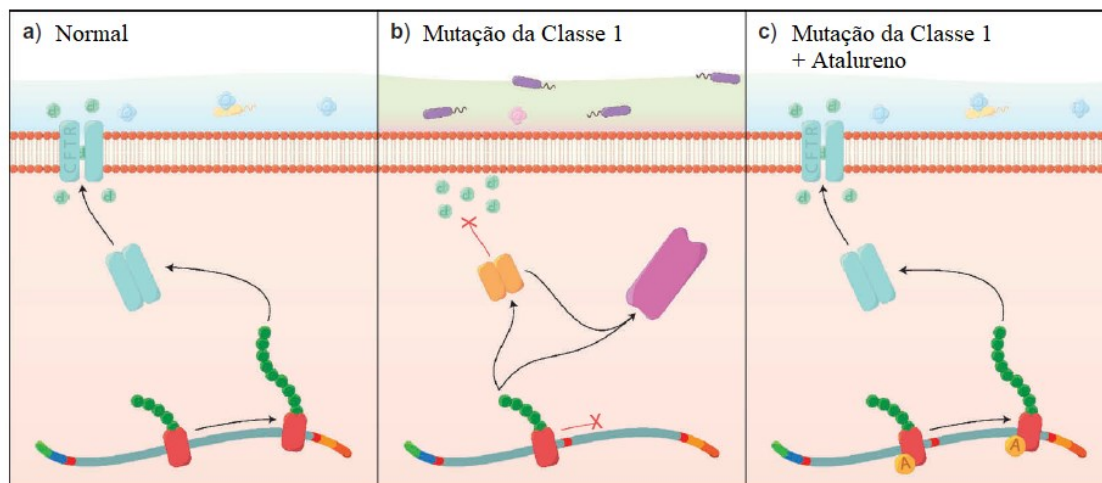
Em 2014, o atalureno, também conhecido por PTC-124, foi aprovado pela EMA para o tratamento de doentes, de idades superiores a 2 anos, com distrofia muscular de Duchenne, causada por mutações *nonsense* (European Medicines Agency, 2018).

As mutações *nonsense* da classe I são responsáveis pela presença de codões de terminação prematuros (CTP) no ácido ribonucleico mensageiro (ARNm), que impedem a tradução completa do mesmo. Consequentemente, o ARNm com CTP pode ser eliminado ou conduzir à produção de proteínas incompletas e disfuncionais (Hubert et al., 2016).

Os doentes portadores destas mutações geralmente apresentam um fenótipo mais severo devido à escassez de proteínas CFTR funcionais. Por isso, a terapêutica nestes casos passa por conseguir a tradução completa do ARNm, evitando o CTP, e pela inibição do processo de eliminação do ARNm mediado por *nonsense*, promovendo assim a produção de proteínas completas e funcionais (Zainal Abidin, Haq, Gardner, & Brodlie, 2017).

O atalureno é um fármaco não-aminoglicosídeo seletivo que, quando administrado por via oral, interage com o ribossoma e permite a leitura integral do gene CFTR, o que faculta a produção de proteínas CFTR normais (figura 14) (Hubert et al., 2016; Zainal Abidin et al., 2017).

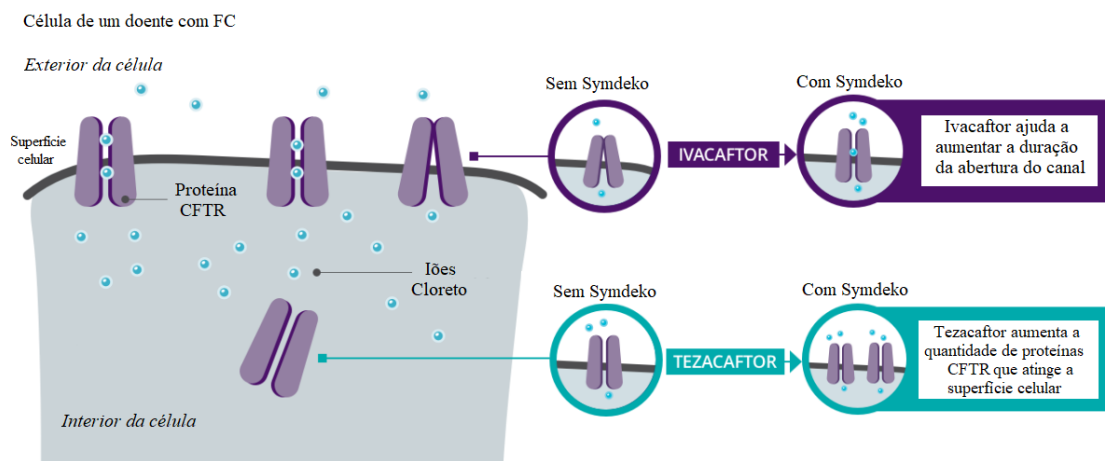
Contudo, nos ensaios clínicos de fase III realizados, onde foram comparados dois grupos, um sob terapêutica com atalureno e outro com placebo, não foram reveladas alterações significativas na função pulmonar (FEV<sub>1</sub> e exacerbações pulmonares), nem na concentração de Cl<sup>-</sup> no suor (Kerem et al., 2014).



**Figura 14:** Mecanismo de ação do atalurenho (Translarna®) (adaptado de Zainal Abidin et al., 2017)

#### 2.4 - Tezacaftor + Ivacaftor (Symdeko®)

O tezacaftor é um novo corretor, com estrutura semelhante à do lumacaftor, que facilita o transporte intracelular e permite que a densidade de proteínas CFTR na superfície celular aumente (figura 15) (Durmowicz & Chowdhury, 2018).



**Figura 15:** Mecanismo de ação do tezacaftor/ivacaftor (Symdeko®) (Vertex, 2018c).

No início do ano de 2018, foi aprovada a combinação tezacaftor/ivacaftor pela FDA, para o tratamento de doentes com FC de idades superiores a 12 anos, que sejam homozigóticos para a mutação Phe508del, ou que tenham pelo menos uma das 26 muta-

ções específicas que respondem a esta terapêutica (Vertex, 2018c).

Em pacientes medicados com esta combinação terapêutica, o transporte de  $\text{Cl}^-$  pode sofrer um aumento de 2,5 a 8,1% dos valores normais. No entanto, ensaios clínicos de fase II demonstraram que, com a combinação de tezacaftor/ivacaftor, o transporte de  $\text{Cl}^-$  sofre um aumento de 15,7% (Shoseyov, Cohen-Cymberknoh, & Wilschanski, 2018).

Ainda em ensaios clínicos de fase II, doentes portadores de duas mutações diferentes (Phe508del/Gly551Asp) sofreram um aumento de 4,6% do  $\text{FEV}_1$ , e uma diminuição da concentração de  $\text{Cl}^-$  de 7,02 mmol/L. Assim, é possível uma redução significativa do risco de exacerbações pulmonares em indivíduos a realizar esta terapêutica (Shoseyov et al., 2018).

Relativamente ao perfil de eficácia, este é semelhante em ambas as combinações terapêuticas, tezacaftor/ivacaftor e lumacaftor/ivacaftor. Apesar disso, o tezacaftor é um fármaco que não interage com o ivacaftor, ao contrário do lumacaftor, o que é diretamente benéfico para o doente, e permite que o perfil de segurança seja superior na combinação tezacaftor/ivacaftor (Durmowicz & Chowdhury, 2018).

Como este medicamento foi aprovado recentemente, ainda não existem dados suficientes para serem retiradas conclusões sobre a eficácia e segurança em regime terapêutico de longo prazo (Shoseyov et al., 2018). Contudo, este medicamento provavelmente será também aprovado pela EMA nos próximos tempos, tendo em conta os seus benefícios em relação às combinações terapêuticas já existentes na Europa.

### 3 - Terapêutica Genética

Na FC, os defeitos causados pelas mutações no gene CFTR podem ser corrigidos de duas formas: através da utilização de medicamentos que melhoram o transporte de  $\text{Cl}^-$ , como os corretores/potenciadores referidos na secção anterior; ou por adição de genes terapêuticos, correção ou *knockdown* (eliminação da expressão) dos genes mutados (terapia genética) (Bhandari, Milic, Lamichhane, Blake, & Bhandari, 2018; Kay, 2011).

A terapia genética, ao contrário da convencional, tem como objetivo tratar ou curar uma doença atuando na sua origem (Villate-Beitia, Zarate, Puras, & Pedraz, 2017). É maioritariamente estudada para doenças monogénicas, ou doenças que não apresentam nenhuma alternativa terapêutica satisfatória (Bhandari et al., 2018). Com isto, poderiam ser prevenidos muitos dos problemas causados pela evolução de uma doença, ao iniciar o tratamento o mais cedo possível (Villate-Beitia et al., 2017).



Atualmente, as técnicas de adição de genes são as mais testadas em ensaios clínicos. Estas fornecem benefícios terapêuticos ou proteínas funcional que estejam em falta devido às mutações que ocorreram no genoma. Ainda assim, as técnicas de correção/alteração dos genes, apesar de não tão usuais, têm captado a atenção com as novas tecnologias de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante (Kay, 2011).

Nos últimos 20 anos, a FC tem sido o centro das atenções neste âmbito (Hart & Harrison, 2017). Esta é uma doença genética autossômica recessiva e, por isso, a correção de um dos alelos é suficiente para reverter a doença, pois um indivíduo heterozigótico para uma determinada mutação é apenas portador e fenotipicamente normal (Villate-Beitia et al., 2017).

Os problemas que envolvem as vias respiratórias são os mais preocupantes, no entanto, à nascença os pulmões encontram-se num estado saudável, o que indica uma ótima oportunidade terapêutica, se o tratamento for realizado numa fase inicial (Burney & Davies, 2012). Posto isto, sendo que o envolvimento das vias respiratórias é característico da doença, então, as células epiteliais das vias aéreas são o principal alvo desta terapia (Bhandari et al., 2018).

A administração, neste tipo de terapias, tanto pode ser realizada *in vivo*, como *ex vivo* utilizando as células dos pacientes, e o gene terapêutico pode integrar o cromossoma do paciente ou permanecer circular dentro do núcleo (na forma episomal) (Kay, 2011).

No entanto, um gene não é funcional quando introduzido diretamente numa célula, e a dimensão do ADN requer a utilização de vetores para ajudar na sua transferência para o interior da célula (Fajac & De Boeck, 2016). Nesta terapêutica são utilizados agentes de transferência genética (ATG), escolhidos consoante o tipo de célula alvo, o número de tratamentos a submeter e o tamanho do gene a transferir (Bhandari et al., 2018).

Os ATG foram desenvolvidos de modo a facilitar a entrada do ADN na célula/núcleo, e podem dividir-se em duas categorias de vetores, os virais e os não virais (Burney & Davies, 2012).

Atualmente, os vetores virais são os mais utilizados (em cerca de dois terços dos estudos realizados até à data) apesar de hoje em dia os não virais se tornarem cada vez mais comuns (Ginn et al., 2018).

### **3.1 - Sistemas Vetoriais**

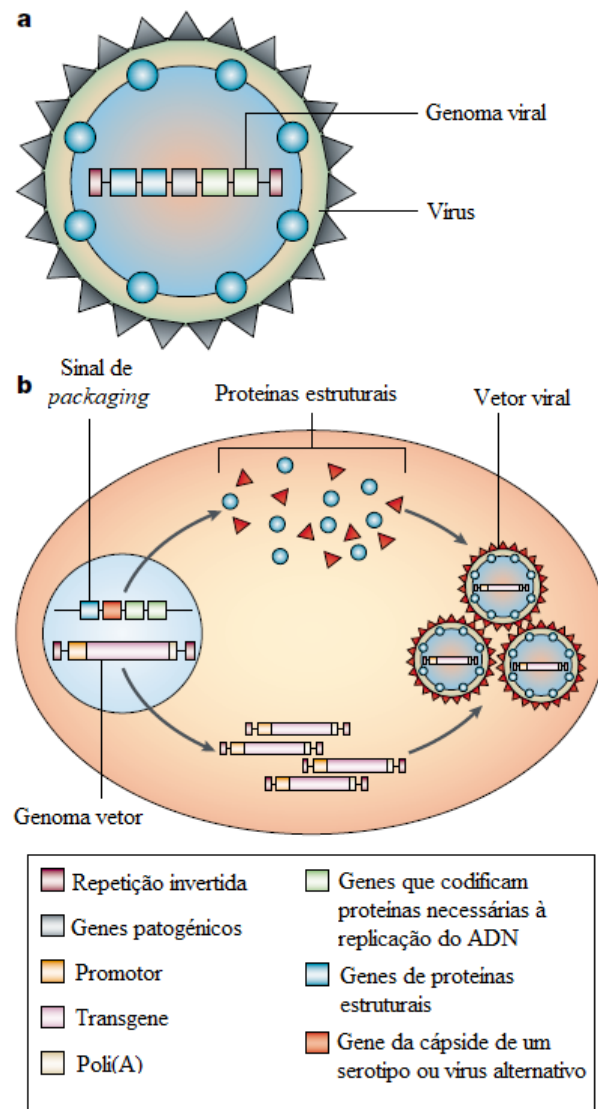
#### **3.1.1 – Sistemas Vetoriais Virais**

A principal vantagem da utilização de vírus como vetores é a sua capacidade inata de transferência de material genético para as células do hospedeiro (Villate-Beitia et al., 2017). O desenvolvimento de vetores virais tem como finalidade manter a habilidade de infecção das células por parte dos vírus, mas que não haja expressão do gene viral que conduz à replicação do mesmo e origina toxicidade (Thomas, Ehrhardt, & Kay, 2003).

Posto isto, para fins terapêuticos, estes necessitam de sofrer modificações em laboratório, de modo a evitar que causem danos no doente, e que possam ser úteis como ferramentas poderosas no que toca à transferência de genes terapêuticos em órgãos alvo (Villate-Beitia et al., 2017).

Este objetivo é atingido através da remoção total, ou parcial, das regiões que codificam o genoma viral, mantendo as sequências responsáveis pelo *packaging* do genoma vetor (a transferir na cápside do vírus), ou pela integração do mesmo na cromatina do hospedeiro. Posteriormente a essa alteração, o gene que se pretende transferir é clonado e inserido no local onde se procedeu à remoção da sequência do genoma viral (figura 16) (Thomas et al., 2003).

O número de diferentes vetores virais encontra-se em crescimento, visto que nos encontramos numa época de grandes desenvolvimentos no âmbito da terapia genética e respetivos vetores. Atualmente consegue-se categorizar os vetores virais mais comuns em 5 grupos diferentes: adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, lentivírus e vírus herpes-*simplex* tipo 1.



**Figura 16:** Modificação de um vírus num vetor viral. **a)** Diagrama esquemático de um vírus. **b)** Formação do vetor viral. Na construção do acondicionamento dá-se a junção da informação genética viral que codifica para as proteínas estruturais e para as proteínas necessárias à replicação do ADN com o genoma vetor. (adaptado de Thomas et al., 2003)

### 3.1.1 a) - Adenovírus

Os adenovírus (Ad) são vírus não envelopados, compostos por uma cadeia dupla de ADN linear, com 36kb, encapsulada por uma cápside icosaédrica de diâmetros entre 70 e 100nm, e permitem a inserção de sequências genéticas de grandes dimensões. O ADN destes organismos, na célula do hospedeiro, permanece na forma episomal, não integrando o genoma (Doerfler, 1996; Kay, 2011).

No seu genoma apresentam-se 4 regiões diferentes: E1, que codifica a ativação da transcrição dos genes E1b, E2a e E2b; E2 que codifica para proteínas responsáveis pela replicação do ADN viral, como a ADN polimerase, *DNA-binding protein* (proteínas de ligação ao ADN) e o terminal-C; e ainda as regiões E3 e E4 (figura 17)(Volpers & Kochanek, 2004).

Estes vírus foram os primeiros vetores virais a serem utilizados nos ensaios clínicos de terapia genética na FC por apresentarem uma eficiente transdução na maioria dos tecidos (Villate-Beitia et al., 2017). No entanto, são capazes de induzir uma resposta inflamatória severa no organismo do hospedeiro, quando administradas as doses necessárias para atingir a eficácia (Kay, 2011).

#### *Primeira Geração*

Na primeira geração, a principal modificação foi a substituição da região E1 pelo transgene, de modo a que a transcrição do gene viral ficasse inibida e não houvesse replicação do ADN viral, em condições normais. Ainda assim, também podem apresentar uma deleção adicional na região E3, de modo a aumentar a capacidade disponível para introdução do transgene (figura 17) (Volpers & Kochanek, 2004).

Infelizmente, as células sujeitas a transdução com estes vetores expressavam pequenas quantidades de genes de Ad e, por isso, induziam uma forte resposta citotóxica pelas células T, que eliminavam rapidamente a expressão do transgene (Thomas et al., 2003).

Entretanto, os Ad têm sido estudados e modificados de modo a reduzir a sua capacidade imunogénica, que é o fator limitante que promoveu o desuso dos vetores desta geração (Thomas et al., 2003).

#### *Segunda Geração*

Na segunda geração, para além das alterações realizadas na primeira, ainda foram adicionadas outras deleções ou inativações nas regiões E2/E4, com o objetivo de aumentar a persistência do transgene, e diminuir a resposta inflamatória (figura 17) (Volpers & Kochanek, 2004).

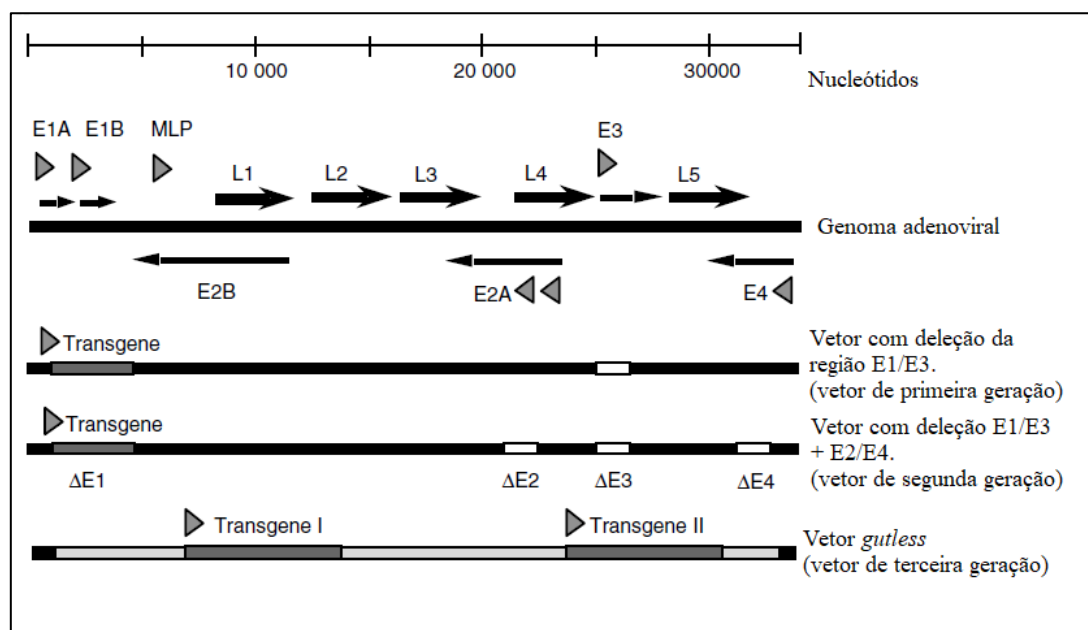
Com esta geração foi alcançada uma redução na toxicidade resultante destes vetores, devido à remoção de um maior número de genes virais em comparação com a primeira geração (Thomas et al., 2003). No entanto, ainda não se resolveu na totalidade o problema da imunogenicidade (Volpers & Kochanek, 2004).

### Terceira Geração

O maior avanço no desenvolvimento destes vetores foi a remoção total da informação genética viral (vetores *gutless*), mantendo apenas os elementos virais indispensáveis à terapia, como as *inverted terminal repeats* (ITRs) e a sequência de *packaging* (figura 17) (Volpers & Kochanek, 2004).

Assim, é possível a inserção de 36kb de ADN não viral (quantidade inicial de ADN viral), para se proceder à transferência de informação genética importante para uma terapia eficaz. Caso não seja necessária essa capacidade, é inserido um ADN sem codificação específica, também denominado *naked DNA*, apenas para preencher o espaço disponível e perfazer os 36kb que o genoma do vetor inicialmente possuía (Volpers & Kochanek, 2004).

Recentemente, esta geração de vetores demonstrou em modelos animais que será possível alcançar o objetivo pretendido, de reduzir a imunogenicidade *in vivo*, prolongar a duração da expressão do transgene e melhorar as expectativas da terapia genética a longo termo (Thomas et al., 2003).



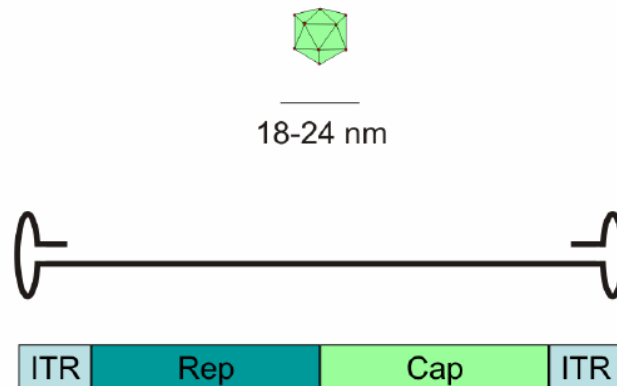
**Figura 17:** Organização genômica do adenovírus e respetivos vetores possíveis (adaptado de Volpers & Kochanek, 2004)

Por fim, estes vetores ainda não foram administrados a humanos por não estar comprovado que estão totalmente desprovidos de toxicidade (Kay, 2011).

### 3.1.1 b) - Vírus Adeno-associados

Os vírus adeno-associados (VAA) são vírus não envelopados, compostos por uma cadeia de ADN simples, com cerca de 5kb e de pequena dimensão com diâmetros entre 18 a 26nm (Kay, 2011; Villate-Beitia et al., 2017). Estes vírus pertencem à família *Parvoviridae*, e na sua forma *wild-type* é conhecido por não estar associado a nenhuma doença humana (Villate-Beitia et al., 2017).

O genoma dos VAA encontra-se flanqueado por duas sequências palindrómicas, as ITR, que são a origem e a iniciação da replicação do ADN viral. Na sua estrutura apresentam dois genes, o gene *rep* que está envolvido na replicação do genoma viral e facilita a integração do mesmo no genoma do hospedeiro, e o gene *cap* que codifica proteínas estruturais que são responsáveis pela construção da cápsula viral (figura 18) (Carvalho, 2010).



**Figura 18:** Organização genómica do Vírus Adeno-associado *wild-type* (adaptado de Carvalho, 2010).

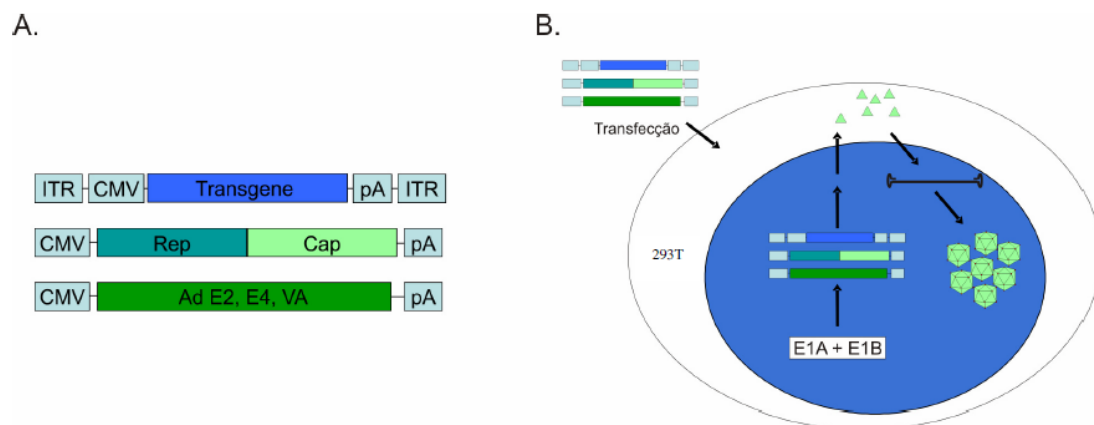
No entanto, para que a replicação do vírus aconteça, não é suficiente a presença destes genes. Os VAA são vírus que, para que essa replicação de proceda, necessitam do auxílio de outros vírus, denominados por vírus *helper* (Kay, 2011).

Os vetores de VAA são promissores no âmbito da terapia genética (Thomas et al., 2003). A alta eficiência na transdução, a persistente expressão genética episssomal a longo prazo, a transferência estável de material genético sem risco de toxicidade ou resposta in-

flamatória associada, para o interior de células tanto em divisão como já diferenciadas, e ainda a ausência de patogenicidade do *wild-type* VAA, são muitas das características dos vetores VAA que são desejáveis a este tipo de terapia (Abrunheiro & Vasco, 2016; Carvalho, 2010).

A construção dos vetores de VAA é realizada através de um processo de transfecção em células 293 T. Estes são criados a partir da inserção do gene terapêutico no intervalo entre as ITRs, eliminando assim toda a informação genética responsável pela transfecção e replicação viral, à semelhança do que acontecia na última geração dos vetores Ad (Carvalho, 2010).

Ainda, como referido anteriormente, para que se procedam a replicação e capsidação, é necessária a presença de um vírus *helper*, como Ad ou herpes vírus, que forneça os genes responsáveis por esses processos (gene *rep*, gene *cap* e gene E2 e E4 dos Ad para que haja expressão genética) (figura 19) (Abrunheiro & Vasco, 2016).



**Figura 19:** Representação esquemática da produção de vetores VAA. **A)** Representação dos plasmídeos utilizados na produção do vetor VAA. **B)** Processo de transfecção em célula 293 para produção do vetor VAA. (adaptado de Carvalho, 2010)

Para obter a preparação final purificada, o vírus *helper* é inativado por ação do calor e, posteriormente, o vetor VAA é separado por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl) (Carvalho, 2010).

Por fim, apesar de estes vetores apresentarem diversas vantagens, este é claramente um processo moroso e que requer a utilização de dois tipos diferentes de vírus

e, por isso, apresenta algum risco de contaminação da preparação final por parte do vírus *helper* (Carvalho, 2010).

### 3.1.1 c) - Retrovírus

Os retrovírus (família *Retroviridae*) são vírus envelopados, compostos por uma cadeia simples de ARN, e apresentam um mecanismo de replicação viral no interior da célula do hospedeiro característico desta família, a transcrição reversa. A transcrição do genoma é realizada pela enzima transcriptase reversa, que produz ADN a partir do ARN viral e, consequentemente, este é integrado no genoma do hospedeiro pela enzima integrase, dando origem ao provírus (Geiger, Aneja, & Rudolph, 2009).

Os vetores retrovirais são produzidos em baixas concentrações, a sua transdução para que seja viável requer integração proviral no cromossoma do hospedeiro, infetam apenas células em divisão, e a sua utilização *ex vivo* é preferida, devido à pouca eficiência e ao perfil subterapêutico quando aplicado *in vivo* (Kay, 2011).

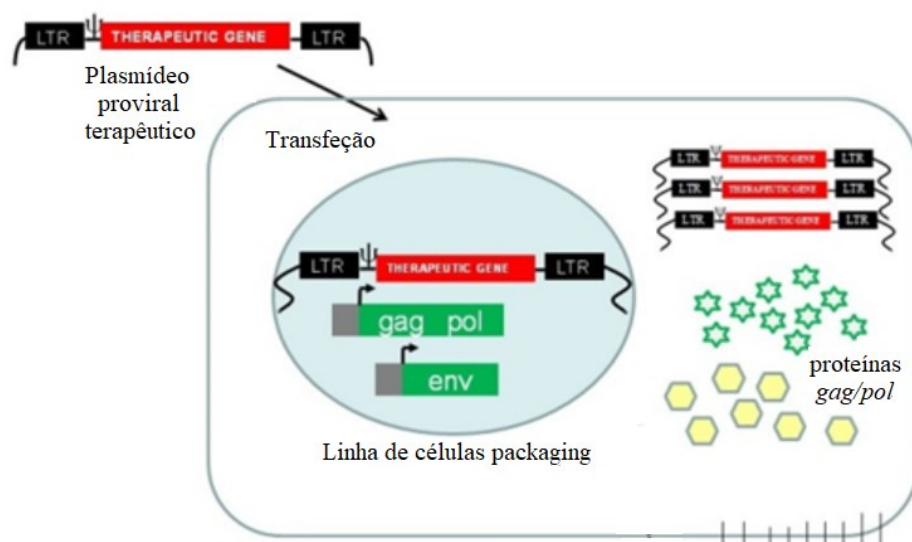
Contudo, garantem uma expressão transgénica a longo prazo, e dentro desta família de vírus, existem também os lentivírus que têm a capacidade de infetar células que já não se encontram em fase de divisão (Kay, 2011).

O genoma retroviral possui um *primer binding site* (PBS), um sinal de *packaging* (*psi*), três genes (*gag*, *pol* e *env*) e um trato de polipurina (PPT), todos flanqueados por sequências *long terminal repeat* (LTR). O PBS é responsável pela iniciação da transcrição reversa, através da ligação do ARN transportador (ARNt). A sequência *gag* codifica quatro proteínas: p10 (da nucleocápside), p12 e p15 (da matriz) e ainda p30 (da cápside viral). A sequência *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase. A sequência *env* codifica uma poliproteína que, quando clivada pela protease viral, origina a gp70 (glicoproteína de superfície) e a p15E (proteína transmembranar). E por fim, a sequência PPT, que é responsável por iniciar a atividade da transcriptase reversa (Gene Therapy Review, 2008; University of Cincinnati, 2014).

Na produção de vetores retrovirais, procede-se à remoção dos genes *gag*, *pol* e *env* e, posteriormente, à inserção do transgene, tornando-os incapazes de se replicarem, mas capazes de transportarem o gene terapêutico. Ainda assim, mantém-se o sinal *psi* e as sequências LTR, permitindo a expressão do transgene, e do *packaging* em cápside viral (Gene Therapy Review, 2008).



Posto isto, de modo a facilitar a produção destes vetores, foram introduzidos em células murinas/humanas à parte do plasmídeo portador do gene terapêutico, os genes essenciais (*gag*, *pol* e *env*) responsáveis pela replicação viral (figura 20). No entanto, assim continua a existir possibilidade de produção de pequenas quantidades de genes virais, o que apresenta um risco para a utilização destes vetores (Gene Therapy Review, 2008).



**Figura 20:** Representação esquemática de um exemplo de um vetor retroviral (adaptado de Balajthy et al., 2011).

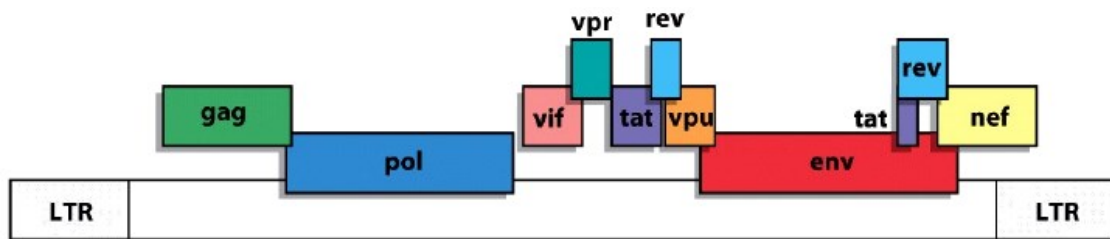
### 3.1.1 d) - Lentivírus

Os lentivírus (Lv) são vírus envelopados, compostos por uma cadeia simples de ARN e de diâmetro correspondente a 120nm. Estes vírus pertencem à família *Retroviridae*, como já referido, conhecida pelo processo de transcrição reversa de ARN para ADN, e quando no interior da célula do hospedeiro, não integram o cromossoma e apresentam expressão episomal, tal como nos Ad e VAA (Villate-Beitia et al., 2017).

A família dos retrovírus é capaz de integrar a informação genética que transporta, no genoma de células em divisão do hospedeiro, no entanto, os Lv são conhecidos pela particularidade de conseguirem transportar a informação para o interior de células já diferenciadas (University of Cincinnati, 2014). Ainda, a expressão persistente do transgene e a ausência de expressão de proteínas virais após transdução do vetor, são vantagens que competem aos Lv (Villate-Beitia et al., 2017).

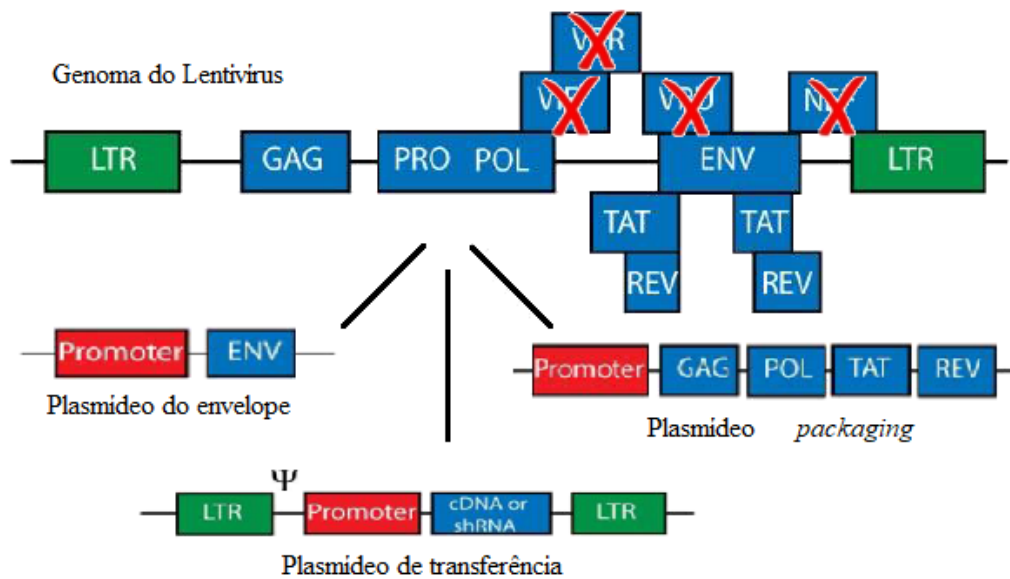
Apesar de existirem diversos tipos de vírus pertencentes a este gênero, como o vírus da imunodeficiência felina (VIF) e o vírus da anemia infecciosa equina (VAIE), o vírus mais comumente utilizado como vetor em terapia genética é o da imunodeficiência humana (VIH) (University of Cincinnati, 2014).

O genoma dos Lv é complexo, e sendo que o uso do VIH é mais recorrente, será abordada a estrutura específica deste vírus. Na sua composição, entre duas sequências LTR, apresenta: 3 genes comuns aos retrovírus, o *gag*, o *pol* e o *env*; dois genes, o *tat* e o *rev*, que têm função reguladora da transcrição e pós-transcrição; e ainda 4 genes acessórios, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, indispensáveis ao crescimento, replicação e patogenicidade *in vivo* do vírus (figura 21) (University of Cincinnati, 2014).



**Figura 21:** Representação esquemática do genoma do lentivírus (VIH) (adaptado de University of Cincinnati, 2014)

Na criação de um vetor Lv, os genes acessórios são retirados da sua constituição (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*). Os genes essenciais (*gag*, *pol*, *tat*, *rev* e *env*), de modo a contornar a probabilidade de reversão do processo, são separados em diferentes plasmídeos (figura 22) (University of Cincinnati, 2014).



**Figura 22:** Organização genômica do lentivírus e respectivos vetores (adaptado de University of Cincinnati, 2014).

### *Primeira Geração*

Nos primeiros vetores Lv, os genes essenciais repartiam-se apenas por um plasmídeo *packaging*, que incluía todos os genes VIH, exceto o gene *env* e o transgene, que se encontravam em dois plasmídeos diferentes (University of Cincinnati, 2014).

### *Segunda Geração*

Posteriormente, como ficou demonstrado que os genes acessórios eram dispensáveis, o plasmídeo *packaging* já apresentava apenas quatro genes (*gag*, *pol*, *tat* e *rev*), e mantinham-se os plasmídeos com o transgene e o gene *env* (University of Cincinnati, 2014).

### *Terceira Geração*

Por fim, na última geração, o gene *tat* foi retirado do plasmídeo *packaging*, e foram gerados dois plasmídeos diferentes, um com os genes *gag* e *pol*, e outro com o gene *rev*, não havendo novamente alterações nos plasmídeos que contêm o transgene e o gene *env* (University of Cincinnati, 2014).

Recentemente, o interesse no uso de vetores Lv em terapia genética aplicada à FC tem vindo a aumentar. Nestes vetores, a inserção de um gene terapêutico não encontra limitações em termos de espaço, ao contrário do que acontece com os vetores Ad e VAA, por isso, um gene CFTR completo poderia ser integrado, o que é um fator promissor. Contudo, o verdadeiro grau de segurança não é totalmente conhecido (Hart & Harrison, 2017).

### 3.1.1 e) - *Vírus Herpes-Simplex tipo 1*

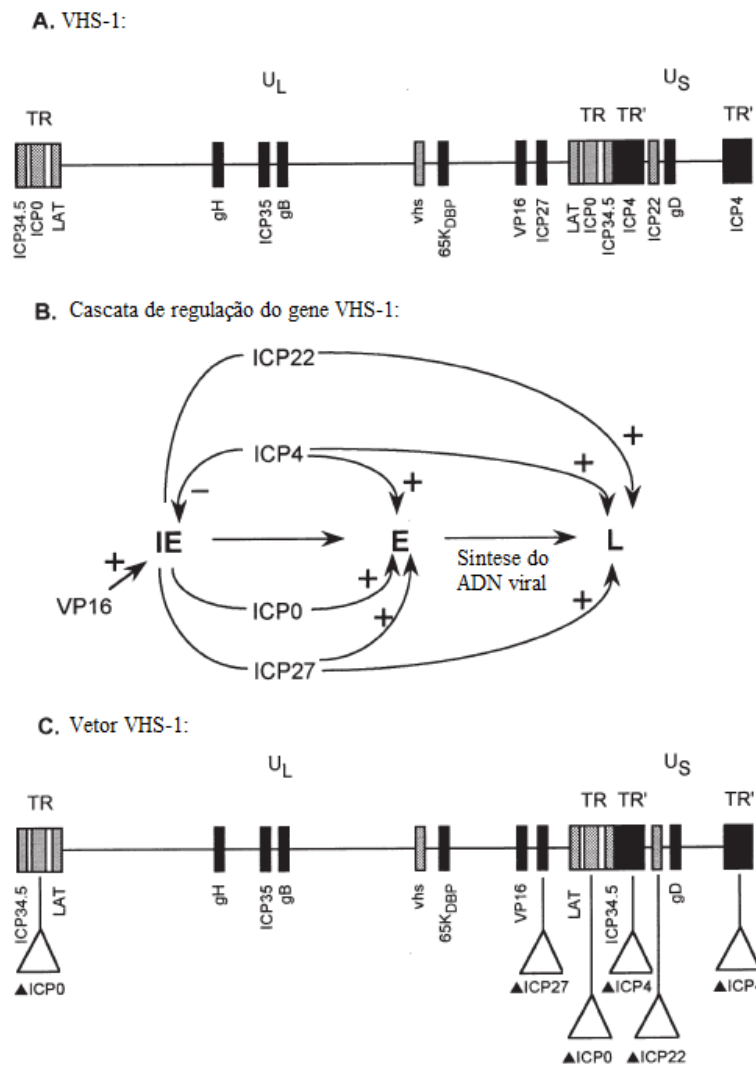
O vírus herpes-*simplex* tipo 1 (VHS-1) pertence à família *Herpesviridae*. É um vírus envelopado, com 250nm de diâmetro, composto por uma cápside icosaédrica e ADN de cadeia dupla, com 150kb, que codifica mais de 80 proteínas (Nygårdas, 2013; Robbins & Ghivizzani, 1998).

Normalmente está associado a infeções orofaciais (como o herpes labial) e gengivo-estomatites da cavidade oral. Também está, por vezes, relacionado a infeções oculares (queratite herpética, conhecida como a maior causa de cegueira por infeção viral) e inflamações severas do sistema nervoso central (SNC) (Nygårdas, 2013).

A habilidade inata de infeção de células já diferenciadas, a capacidade de estabelecer latência em determinados tipos de células e de transportar grandes sequências de ADN exógeno, são algumas das vantagens inerentes à utilização destes vírus como ATG (Robbins & Ghivizzani, 1998).

A produção de vetores VHS-1 requer que a capacidade de provocar toxicidade não esteja presente, a segurança da sua utilização seja notável e que estes possuam promotores capazes de reprimir o genoma viral. No entanto, para isso é imprescindível que os vetores VHS-1 estejam desprovidos de toda a informação genética responsável pela replicação e citotoxicidade (Lachmann, 2004).

O genoma do VHS-1 é composto por duas unidades, uma longa ( $U_L$ ) e outra curta ( $U_S$ ), flanqueadas por duas sequências *terminal repeats* (TR). Na sua constituição apresenta diversos genes, sendo que apenas cinco deles são essenciais ao ciclo de replicação do vírus: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47 (figura 23A) (Glorioso, 2014).



**Figura 23:** Estrutura do VHS-1. **A)** Representação esquemática do genoma do VHS-1. Localização espacial da região longa e curta ( $U_L$  e  $U_S$ ) do vírus, e respectivos genes essenciais e acessórios. **B)** Regulação do ciclo de vida do vírus. **C)** Representação esquemática de um vetor VHS-1 (adaptado de Robbins & Ghivizzani, 1998).

A proteína viral V16 é responsável pela iniciação da expressão dos genes virais, pois estimula a expressão dos primeiros genes precoces (GP) e respectivas proteínas, que ativam outros genes essenciais à síntese de ADN e ao *packaging* viral (figura 23B). Ainda assim, outras proteínas acessórias não essenciais ao processo de replicação viral podem ser removidas de modo a disponibilizar espaço à inserção de um ADN exógeno de maior dimensão (Robbins & Ghivizzani, 1998).

Na produção de vetores VHS-1 a principal preocupação é a toxicidade que o vetor poderá apresentar nos diversos tipos de células do hospedeiro. Por isso, a deleção dos pro-

duto dos GP, tem como objetivo a redução dessa toxicidade e antigenicidade, e ainda aumenta o tempo de expressão do gene *in vivo* (Robbins & Ghivizzani, 1998).

Existem três tipos diferentes de vetores VHS-1: vetores de replicação defetiva; vetores de replicação condicionada; e os vetores *amplicons* (Nygårdas, 2013).

### *I) Vetores de Replicação Defetiva*

#### *Primeira e Segunda Geração:*

A primeira estratégia de produção de vetores VHS-1 era semelhante à descrita anteriormente nos Ad. Tendo em conta que com a inativação de um dos genes essenciais ICP0, ICP4, ICP22 e ICP27, se obtém um vetor incapaz de se replicar, começou-se pela deleção dos genes ICP4 e ICP27, que leva então à interrupção do crescimento viral, numa fase inicial. No entanto, este é um fator limitante à engenharia e produção destes vetores, pois são genes essenciais à replicação do vírus (Nygårdas, 2013).

Entretanto, foram produzidas linhas celulares capazes de integrar estes genes, permitindo a produção de um vetor *backbone*, e que expressam apenas os vetores ICP0, ICP22 e ICP47 (Glorioso, 2014).

#### *Terceira Geração:*

Por fim, foram produzidos vetores totalmente desprovidos de todos os genes essenciais, que requerem necessidade de complementaridade por parte de genes como o ICP4, ICP 27 e ICP 0 em células epiteliais do osteossarcoma humano (U2SO) (Glorioso, 2014).

### *II) Vetores de Replicação Condicionada*

Nos vetores de replicação condicionada encontram-se deleções apenas em genes acessórios (como o ICP34.5), responsáveis pela virulência e condicionando-os apenas a determinados tipos de células *in vivo*. Estes são vetores que se podem apresentar atenuados *in vivo*, apesar de funcionarem normalmente em culturas celulares (Nygårdas, 2013).

### III) Vetores Amplicons

Os *amplicons* são vetores auxiliares que transportam apenas a quantidade necessária de genes virais, o que lhes confere menor toxicidade (Nygårdas, 2013). Nesta técnica, o genoma do *amplicon* é originário de um plasmídeo constituído por genes que codificam para o *packaging* (*pac*) e para a replicação (*ori*), do VHS-1. Contudo, é necessário um vírus *helper*, que transporte genes responsáveis pela produção de proteínas envolvidas no processo de amplificação e *packaging* do genoma do *amplicon*, normalmente composto por um cosmídeo com genoma do VHS-1 (Nygårdas, 2013; Robbins & Ghivizzani, 1998).

Os vetores *amplicons*, por possuírem semelhanças ao VHS-1 *wild-type*, são capazes de induzir uma resposta imunológica no hospedeiro, consequentemente afetando a expressão do transgene, e ainda há possibilidade de contaminação por parte do vírus *helper* durante a produção destes vetores, tal como nos de VAA (Nygårdas, 2013).

#### 3.1.2 - Sistemas Vetoriais Não Virais

A veiculação de genes terapêuticos por vetores não virais é uma alternativa mais segura, de fácil produção e a menor custo. Os sistemas vetoriais não virais são capazes de ultrapassar diversas limitações que os virais apresentam: podem ser produzidos facilmente em larga escala, com alta reprodutibilidade; permanecem estáveis após armazenamento; a administração consecutiva destes vetores não induz resposta imunológica e têm capacidade ilimitada no que diz respeito à quantidade de material genético a transportar. Ainda assim, estes vetores não são tão eficientes no processo de transdução, como os vetores virais (Villate-Beitia et al., 2017).

Contudo, apesar das vantagens descritas anteriormente, esta é uma técnica eficiente *in vitro*, mas ainda com baixo sucesso *in vivo*, no que diz respeito à segurança e à eficácia. Estes vetores possuem grandes dimensões e por isso muitas vezes a passagem pela barreira endotelial fica comprometida e, mesmo que consigam ultrapassar essa barreira, há uma enorme probabilidade de serem degradados já nos complexos lisossomais. Ainda, se por ventura não forem degradados até esse ponto, e consigam alcançar o núcleo, a expressão episomal do gene terapêutico ocorre apenas durante um curto espaço de tempo (Kay, 2011).

A transferência genética por meio de vetores não virais pode ser realizada através de *naked DNA* ou por associação destes a lípidos catiónicos (formando lipoplexos) ou a polímeros catiónicos (formando poliplexos), de modo a facilitar o processo de endocitose e de transporte até ao núcleo, onde ocorre a expressão (Geiger et al., 2009; Villate-Beitia et al., 2017).

Entre estes três grupos, os lipoplexos e os poliplexos são extensivamente utilizados em investigações onde a transferência genética é direcionada aos pulmões (Geiger et al., 2009).

### 3.1.2 a) - Lipoplexos

A técnica de transferência de ácidos nucleicos, realizada nos anos 70, era baseada em lipossomas neutros. Nos últimos anos, através da combinação de lípidos naturais com lípidos catiónicos, foram desenvolvidas estruturas mais estáveis em condições fisiológicas, os lipoplexos (Montier et al., 2004).

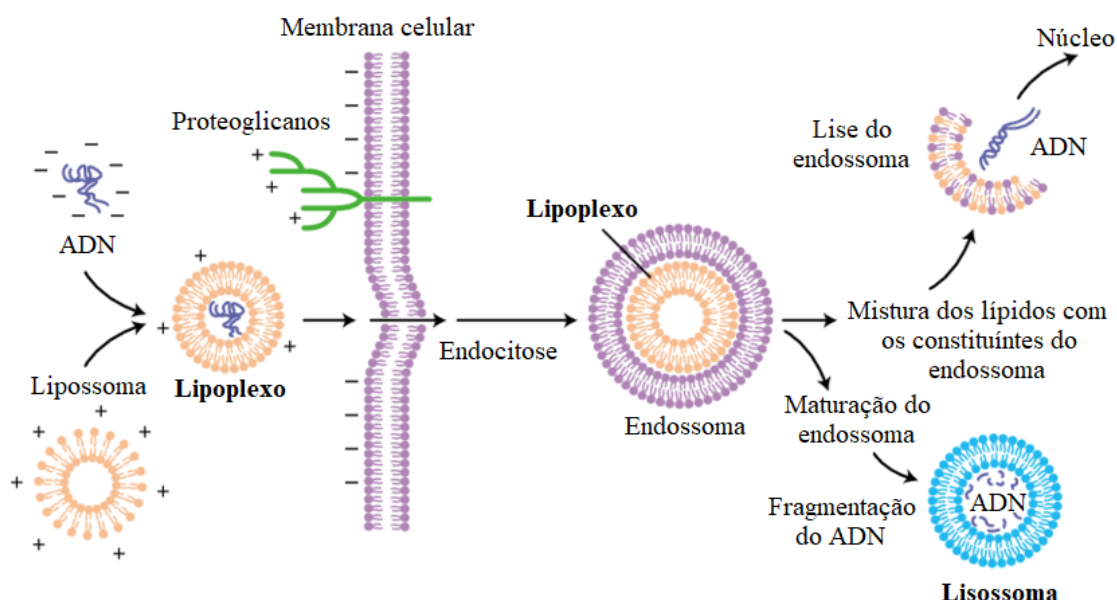
Os lípidos catiónicos são moléculas anfipáticas, compostas por uma cabeça de carga positiva e uma cauda hidrofóbica (Geiger et al., 2009). Normalmente são utilizadas moléculas de colesterol ou fosfatidiletanolamina que, quando combinados com o plasmídeo, formam partículas de diâmetros entre os 100 e 500nm, os lipoplexos (Burney & Davies, 2012).

Os lipoplexos têm o propósito de melhorar a transferência do gene terapêutico, facilitando a entrada do ADN na célula do hospedeiro. (Burney & Davies, 2012). A adição de cargas positivas nesta técnica, origina uma interação entre os lipossomas catiónicos e os ácidos nucleicos de carga negativa, e uma interação electrostática entre o complexo e a membrana celular (Montier et al., 2004). Assim, estes são capazes de penetrar a membrana celular e, conseqüentemente resistir à degradação pelas nucleases, tornando-os um sucesso no âmbito da terapia genética (Burney & Davies, 2012).

Contudo, com a presença de dinucleótidos CpG não metilados no plasmídeo, podem ser geradas respostas inflamatórias *in vivo*, com a ativação das citocinas. Por isso, foram desenvolvidos e testados plasmídeos desprovidos de CpG, que demonstraram uma redução da resposta inflamatória e conferiram uma expressão genética contínua em pulmões de modelos animais.



Atualmente, os ensaios clínicos de terapia genética aplicada à FC, têm por base este tipo de vetores pois são complexos estáveis para administração tópica de aerossóis nos pulmões (Villate-Beitia et al., 2017).



**Figura 24:** Processo de transfeção e endocitose mediada por lipoplexos. Produção de lipoplexos: lipossomas compostos por lípidos catiónicos complexados com ADN. Transfeção e endocitose: Os lipoplexos interagem com os proteoglicanos e fundem com a membrana celular, dando-se a endocitose; durante a maturação do endossoma em lisossoma, pode dar-se a lise do endossoma e o ADN presente no seu interior liberta-se no citoplasma e potencialmente seguirá para o núcleo onde poderá ser iniciada a sua expressão; entretanto, alguns fragmentos de ADN podem sofrer degradação juntamente com o lisossoma (adaptado de Parker, Newman, Briggs, Seymour, & Sheridan, 2003).

### 3.1.2 b) - Poliplexos

Os poliplexos são complexos de ADN com polímeros catiónicos, que formam nanopartículas de tamanhos entre os 50 e os 150nm. Estes polímeros são aplicados nesta técnica com o objetivo de induzir a condensação do ADN e a redução do tamanho do complexo no plasma (Montier et al., 2004; Parker et al., 2003).

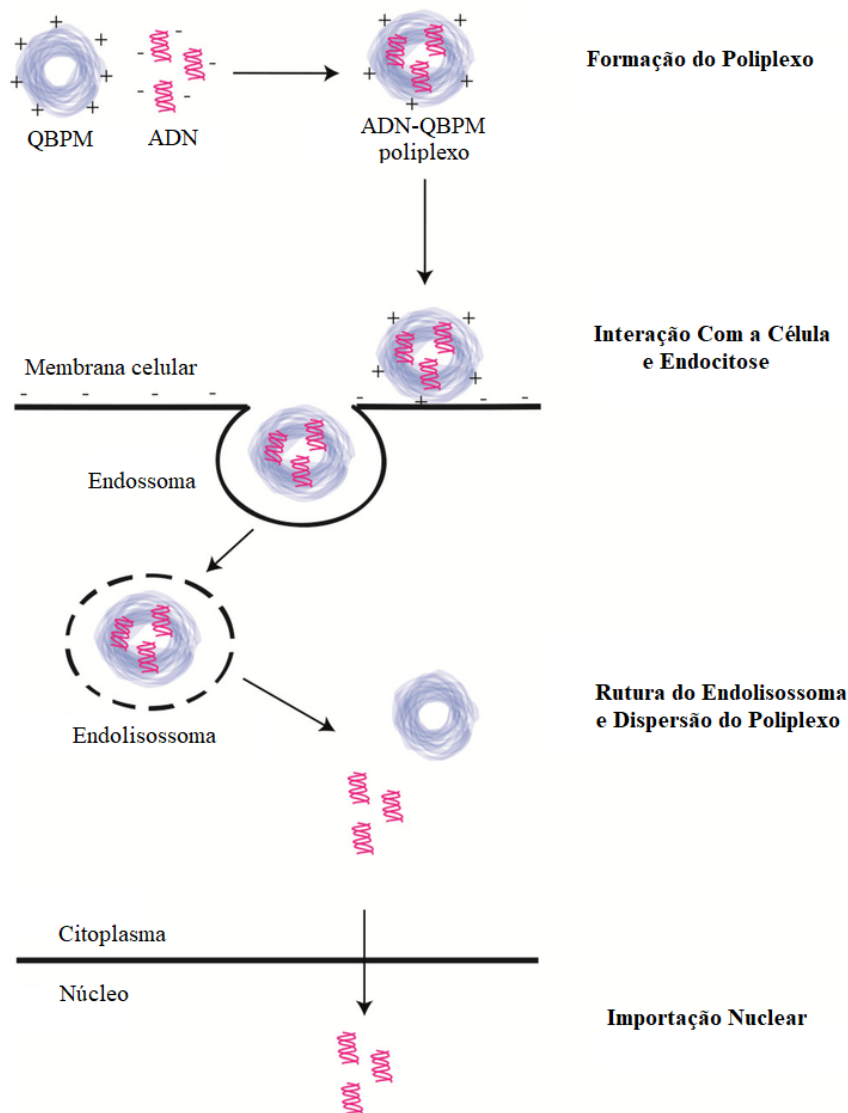
A categorização dos polímeros catiónicos é realizada em função do peso molecular, tamanho da partículas e potencial eletrostático zeta (magnitude da repulsão/atração eletrostática ou das cargas entre partículas). Pois, quanto menos for o peso molecular, na produção maior será o controlo sobre a síntese dos polímeros e maior será também a sua pureza (Montier et al., 2004).

Normalmente, polietilenoimina (PEI), polilisina (PLL), dendrímeros de poliamidoamina, quitosano e polialilamina são os diferentes polímeros catiónicos utilizados na construção de poliplexos. Atualmente, os complexos promissores neste âmbito baseiam a sua composição em PEIs, apesar de também ser muito usual a utilização de PLL. No entanto, encontram-se maioritariamente associados a ensaios que estudam vetores poliplexos com destino ao epitélio das vias respiratórias (Montier et al., 2004; Parker et al., 2003).

Os PEIs são polímeros que promovem um nível de transfeção elevado. Não está definida a justificação para este facto, mas pensa-se que funcionam como um tampão endossomal, devido aos grupos amina protonáveis, que atuam como uma “esponja de prótons”, impedem a acidificação do lisossoma, provocando a sua rutura e inibindo a degradação do ADN, o que consequentemente aumenta a expressão do transgene (figura 25) (Parker et al., 2003).

A microinjeção citoplasmática do complexo ADN-PEI é eficiente e simples. Esperava-se que cerca de 1% das células submetidas a esta técnica expressassem o gene transferido, no entanto, foi demonstrado que mais de 50% das células o fazem, quando se tratam destes complexos, pois ao contrário dos complexos com PLL ou lípidos, não são dependentes do estado em que se encontram as células do hospedeiro (em divisão ou diferenciadas), para que seja finalizada a transfeção (Parker et al., 2003).

Posto isto, os poliplexos apresentam diversas vantagens sobre outros métodos de transferência genética, nomeadamente os lipoplexos. Contudo, a maioria destes polímeros ainda não chegaram à fase de ensaios clínicos humanos, tendo sido apenas testados em modelos animais (Montier et al., 2004).



**Figura 25:** Representação esquemática da formação de um poliplexo ADN-Quitosano de Baixo Peso Molecular (QBPM) e passos do processo de transfeção (adaptado de Agirre et al., 2014).

### 3.2 – Edição Genética

Nos dias de hoje, com o desenvolvimento de novas tecnologias, é possível corrigir genes mutados com precisão, diretamente no seu *locus*. Por isso, teoricamente, na FC seria exequível a restauração da função da proteína CFTR, corrigindo apenas uma determinada mutação específica no gene CFTR, ao invés de ser transferida uma cópia *wild-type* do gene CFTR para o interior da célula do paciente (Villate-Beitia et al., 2017).

O principal benefício destas técnicas passa pelo facto de ser possível uma regulação natural, pelo próprio promotor endógeno, conferindo assim uma expressão nativa, não correndo os mesmos riscos que com a inserção de sequências exógenas passíveis de provocar mutagénese (Villate-Beitia et al., 2017).

A edição genética possibilita uma correção precisa da mutação e, para isso, é necessária a indução de uma quebra na cadeia dupla de ADN (*double-strand break*, DSB), para que durante a reparação do DSB sejam corrigidas as falhas no *locus* do gene, por recombinação homóloga (Sinn, Anthony, & McCray, 2011).

Estas técnicas têm como base a utilização de nucleases, como as *zinc-finger nucleases* (ZFN), *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) e *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* associado a nucleases Cas9 (CRISPR/Cas9) (Hart & Harrison, 2017).

### 3.2.1 – ZFN

As técnicas de edição genética que se baseiam em ZFN são versáteis, eficazes e têm um elevado grau de especificidade. As ZFN são enzimas de restrição sintéticas compostas por dois domínios: *binding* (sequência de ligação ao ADN) e *cleavage* (FokI, endonuclease que realiza a clivagem da sequência de ADN) (figura 26) (Carroll, 2011).

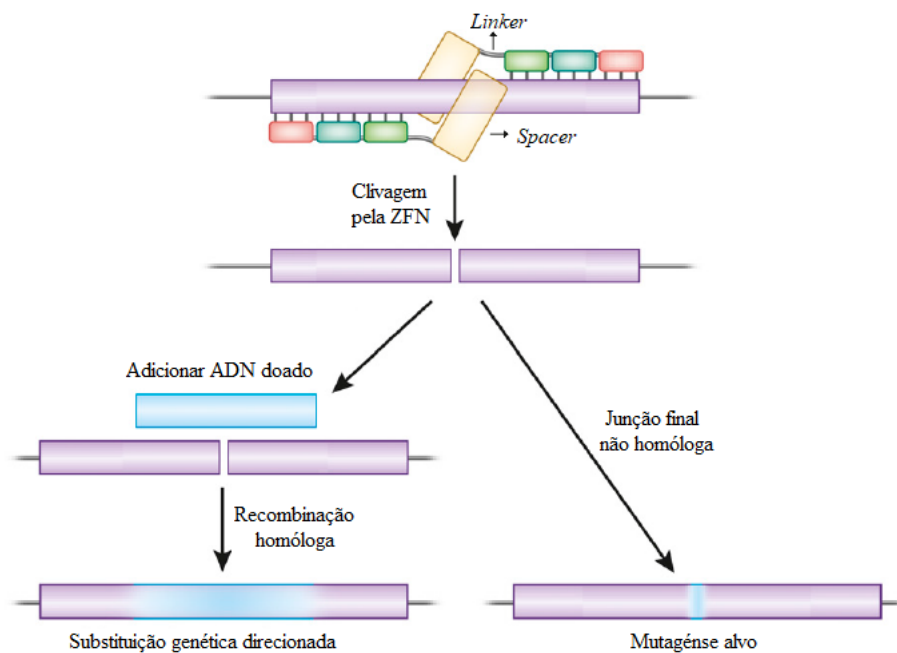
Primeiro, ocorre a ligação dos domínios *binding* à sequência genética alvo e, de seguida, a clivagem da mesma pelo domínio *cleavage*, estimulando assim a reparação do DSB por recombinação homóloga ou junção final não homóloga (figura 26) (Carroll, 2011; Chen et al., 2014).

Contudo, o domínio *cleavage* só é funcional quando se apresenta em forma de dímero, por isso, para que se consiga uma clivagem eficaz, é imprescindível a construção de dois conjuntos *fingers*, cada um possuindo as suas sequências *binding* e um monómero *cleavage* (figura 26) (Carroll, 2011).

Ainda foi demonstrado em diversos estudos que, para uma configuração perfeita e com uma maior seletividade, é necessária a introdução de um *linker* entre os domínios *binding* e *cleavage*, e de um *spacer* de 5-6 pares de bases (pb) entre os locais de ligação do domínio *binding* (figura 26) (Bibikova et al., 2001; Händel, Alwin, & Cathomen, 2009).

Com a configuração ideal, descrita anteriormente, na presença de locais *binding* isolados não é possível ocorrer o processo de clivagem, pois não é possível a formação de um dímero *cleavage*, o que aumenta o grau de seletividade dos ZFN (Carroll, 2011).

Por fim, outra enorme vantagem da utilização destes ZFN é o facto de ser possível alcançar inúmeras sequências alvo, se forem estudadas novas junções de *zinc-fingers*, pois, por exemplo, nos *zinc-fingers* Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (domínios *binding* mais comuns) cada 30 aminoácidos interligam com um átomo de zinco, e cada *finger* contacta com 3 pb do ADN, o que comprova a versatilidade desta técnica (Wolfe, Nekludova, & Pabo, 1999).



**Figura 26:** Ilustração de um conjunto de *fingers* (FokI) ligados ao ADN e respetivo processo de clivagem e reparação genética por recombinação homóloga ou junção final não homóloga. Os domínios *binding* estão representados pelas sequências coloridas (vermelho, azul e verde). Os domínios cleavage estão representados pelos retângulos com sombreado amarelo (adaptado de Carroll, 2011).

### 3.2.2 – TALEN

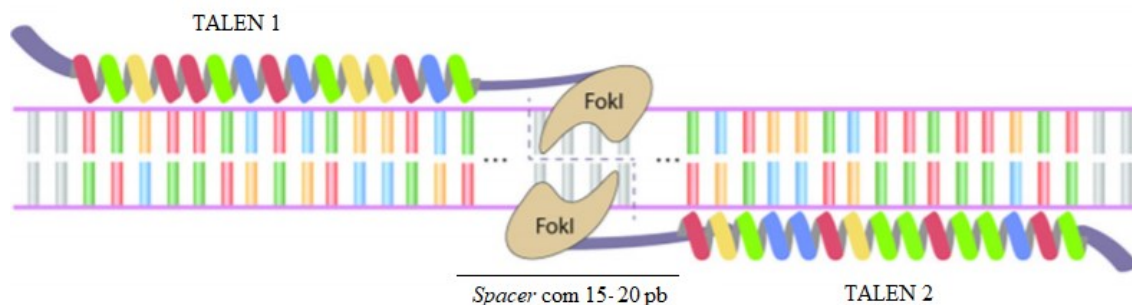
As *transcription activator-like effectors* (TALE) são proteínas secretadas por uma bactéria patogénica para as plantas, a *Xanthomonas*, que afetam processos celulares e, consequentemente, aumentam a suscetibilidade da planta ao agente patogénico. Estas são capazes de ligar ao ADN e ativar a expressão de um determinado gene alvo (Nemudryi, Valetdinova, Medvedev, & Zakian, 2014).

As técnicas de edição genética que utilizam TALEN também promovem uma edição genética precisa e eficiente, através da indução do DSB. À semelhança do que acontece nas ZFN, as TALE são resultantes da fusão de um domínio *binding* (responsável pela ligação ao ADN), e uma endonuclease FokI (figura 27) (Simone, Martínez-Gálvez, WareJoncas, & Ekker, 2018).

O domínio *binding* é composto por monómeros, que são repetições *tandem* de 33-35 resíduos de aminoácidos, à exceção de dois desses resíduos que estão localizados na posição 12 e 13 (*repeat variable diresidue*, RVD), e são responsáveis pelo reconhecimento de um nucleótido específico (Nemudryi et al., 2014).

Normalmente, os TALEN são utilizados em forma de dímeros, separados por um *spacer* de 15-20 pb. A probabilidade de os domínios FokI sofrerem a dimerização é aproximadamente a meio do *spacer* e, por isso, é aí que ocorre a formação do dímero e consequente clivagem do ADN (Simone et al., 2018).

Então, com a descoberta das TALEN foi possível, pela primeira vez, alcançar uma recombinação homóloga direcionada consistente e ainda avançou caminho para o próximo passo, tecnologias de integração direcionada (Simone et al., 2018).



**Figura 27:** Representação esquemática de dois TALENs, separados pelo *spacer* de 15-20 pb onde ocorre a dimerização dos domínios FokI (adaptado de Simone et al., 2018).

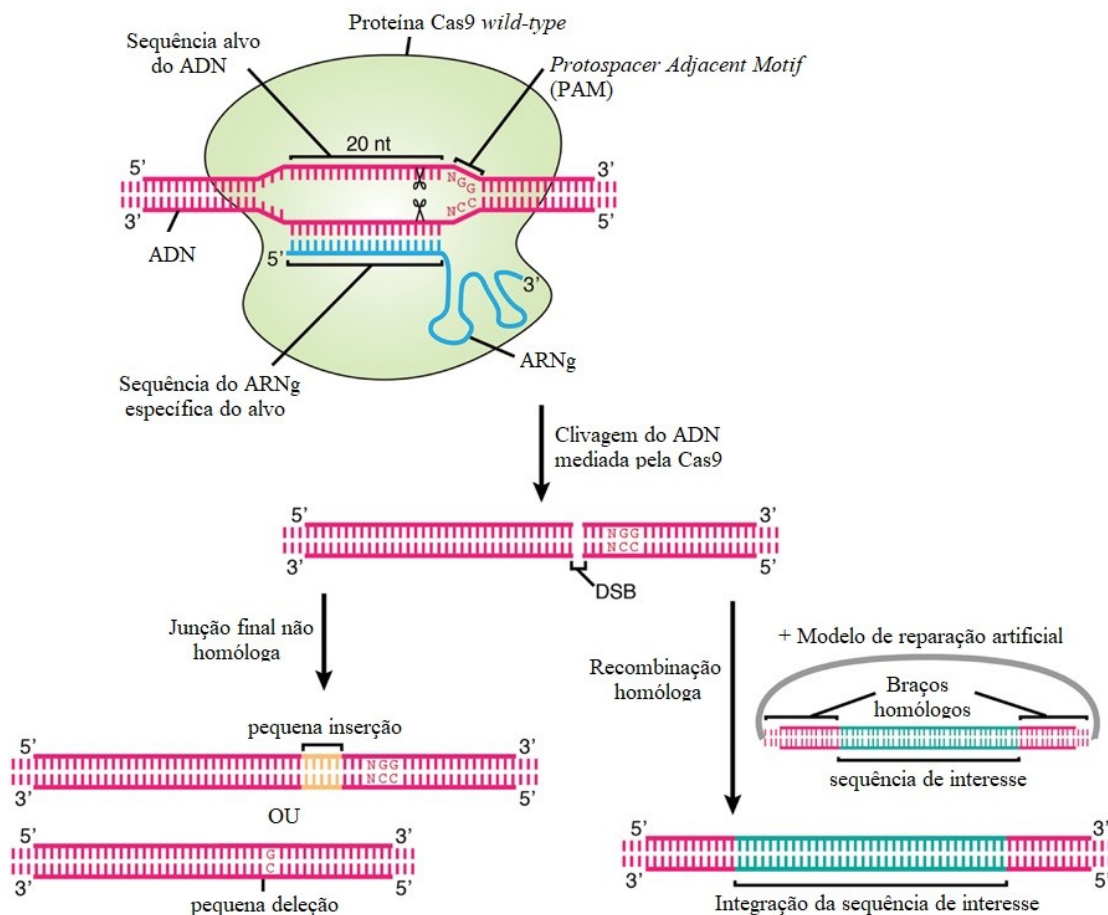
### 3.2.3 – CRISPR/Cas9

Os sistemas CRISPR/Cas9 foram desenvolvidos dois anos após a descoberta das proteínas TALEN. Estes são semelhantes às técnicas que utilizam ZFN e TALEN, contudo, ao invés de proteínas, recorrem a moléculas de ARN (Nemudryi et al., 2014; Villate-Beitia et al., 2017).

Estes provêm do sistema imune-adaptativo de organismos procariontes que reconhecem os materiais genéticos estranhos ao organismo, e destroem-nos. Nos anos 80, foi identificado pela primeira vez este sistema, na bactéria *Escherichia coli* (Gonçalves & Paiva, 2017).

Nos sistemas de CRISPR/Cas9, a nuclease Cas9 encontra-se associada e é conduzida por uma cadeia de ARN (ARNg), que é específica para a sequência alvo de ADN, e se situa junto a um *protospacer adjacente motif* (PAM - sequência alvo da proteína Cas9). No núcleo da célula, a cadeia de ARNg liga-se à sequência alvo e origina uma DSB no ADN, próximo ao PAM (figura 28) (Agrotis & Ketteler, 2015).

Após a clivagem, o processo é semelhante às técnicas anteriores, é estimulada o processo de reparação de ADN, e é realizada por recombinação homóloga com inserção de uma sequência de interesse, ou por junção final não homóloga, podendo haver pequenas inserções ou deleções (figura 28) (Agrotis & Ketteler, 2015).



**Figura 28:** Mecanismo de edição genética através do sistema CRISPR/Cas9 (adaptado de Agrotis & Ketteler, 2015).

Esta técnica de edição genética tem um processo de produção mais custo-efetivo e simples, comparativamente às que utilizam ZFN e TALEN, bem como também é tão ou mais funcional que estas (Villate-Beitia et al., 2017).

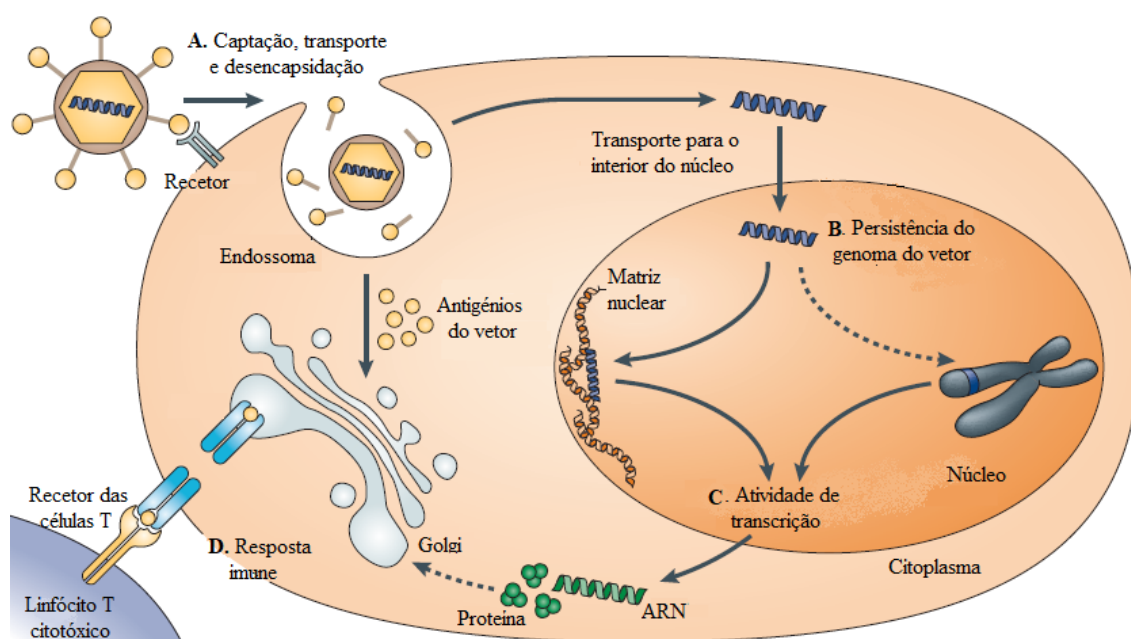
### **3.3 - Barreiras à Terapêutica Genética**

Na prática, a aplicação destas técnicas em doentes com FC não é simples, pois as vias respiratórias não são assim tão acessíveis. Para qualquer que seja o mecanismo de administração utilizado para um determinado sistema vetorial, o epitélio respiratório é o alvo mais desafiante (Burney & Davies, 2012).

As vias respiratórias estão constantemente em contacto com o ambiente externo e, por isso, são desenvolvidos pelo organismo diversos mecanismos de proteção, de modo a impedir a entrada de partículas estranhas ao mesmo, incluindo os vetores de transporte genético. Na FC, este facto encontra-se reforçado devido à elevada hipersecreção e viscosidade do muco, características desta doença (Burney & Davies, 2012).

Contudo, a terapêutica genética encontra-se sujeita a um diverso leque de barreiras. O processo de captação, transporte e desencapsidação do vetor, e a fraca expressão do gene na célula alvo, são duas das barreiras que foram demonstradas pelos vários ensaios clínicos que decorreram nos últimos anos. Mas, ainda assim, a maior barreira ao sucesso desta terapêutica é a resposta imunológica às várias partículas virais e produtos dos transgenes (figura 29) (McCray, 2001).





**Figura 29:** Barreiras ao sucesso da terapia gênica: A) processo de captação, transporte e desencapsidação; B) persistência do genoma do vetor; C) atividade de transcrição; e D) resposta imune do organismo do hospedeiro (adaptado de Kay, 2011).

### 3.3.1 – Processo de Captação, Transporte e Desencapsidação do Vetor

Após a administração tópica ou sistêmica de um determinado vetor, é necessário que o tecido alvo consiga capturar o vetor, para que posteriormente seja realizada a expressão do transgene, e sejam alcançados os níveis terapêuticos (Kay, 2011).

Quanto à distribuição do vetor, logo a seguir à administração, esta depende de vários fatores, como o tamanho do vetor, o suprimento vascular, as barreiras endoteliais de determinados órgãos e ainda interações existentes entre o ligando do vetor e o recetor da célula do hospedeiro (Kay, 2011).

O grau de toxicidade também pode variar em função do vetor utilizado, do alvo a alcançar e ainda em função do produto resultante do transgene. Por isso, o ideal seria a utilização de um vetor específico para um determinado tipo de célula, ou seja, desenvolver vetores não virais com ligandos específicos ou vetores virais com proteínas da cápside/envelope modificadas e direcionadas a uma célula específica (Kay, 2011).

Contudo, esta alternativa quando posta em prática, não demonstrou sucesso devido ao aumento do tamanho do vetor, à diminuição da sua estabilidade e ainda à dificuldade aumentada na passagem do citoplasma para o núcleo. Apesar de os vírus terem mecanismos eficientes de entrada nas células, a maior barreira é o facto de os vetores não virais manterem a dificuldade em libertarem-se dos endossomas, e em passarem pela membrana nuclear (Kay, 2011).

### 3.3.2 – Persistência do Genoma do Vetor

Em alguns dos vetores descritos anteriormente, após a sua entrada na célula do hospedeiro, o transgene encontra-se na forma epissomal nunca sendo integrado no cromossoma, podendo assim perder-se no meio do processo de divisão celular (Doerfler, 1996; Kay, 2011).

Contudo, nestes casos, quando o transgene é transferido para tecidos estáveis, em repouso, com um turnover celular lento (como o fígado, cérebro, coração e alguns músculos) pode conseguir permanecer eternamente no hospedeiro (Kay, 2011).

Ainda assim, os vetores em que o ADN integra o cromossoma do hospedeiro são mais indicados para terem como alvo células com um turnover mais acelerado (como células estaminais hematopoiéticas) (Kay, 2011).

### 3.3.3 – Atividade de Transcrição

A expressão do transgene, para ser eficaz, deveria apresentar uma duração igual à necessária para o tratamento de uma determinada doença genética. Na maioria dos casos, é indispensável que a expressão genética seja vitalícia o que, para que se possa alcançar esse objetivo, implica várias readministrações dos vetores terapêuticos ao longo da vida (Kay, 2011).

### 3.3.4 – Resposta Imune do Organismo do Hospedeiro

A resposta imune direcionada tanto ao produto dos transgenes, como às partículas vectoriais, é a maior barreira ao sucesso da terapia genética. É impossível prever a reacção imunológica em humanos, quer a resposta imune inata como a antígeno-dependente (Kay, 2011).

O propósito do sistema imunológico humano é de defender o organismo de partículas estranhas ao mesmo, como bactérias e vírus. E esta reação, caso ocorra, poderá vir a limitar o processo de transdução, ou a expressão do transgene (Wu & Ertl, 2008).

Por isso, é importante controlar a resposta imune para se proceder à transferência genética de modo a garantir a segurança do paciente e a eficácia da terapêutica. Isto pode ser possível se a transferência genética por sistemas vetoriais virais for combinada com imunossupressores. No entanto, esta combinação apresenta um risco para o paciente que não se pode garantir ser superado pelo benefício da terapêutica, visto ser ainda uma terapêutica experimental (Wu & Ertl, 2008).

### **3.4 – Evidências Científicas**

#### **3.4.1 – Vetores VAA**

##### **3.4.1 a) Ensaios Pré-clínicos**

Muitos ensaios pré-clínicos foram realizados com o objetivo de demonstrar a segurança e a eficácia da transdução e da expressão genética a longo termo, tendo por base os vetores VAA (Guggino & Cebotaru, 2017).

Foram isoladas células dos pólipos nasais, de doentes com FC. A infecção dessas células com vetores VAA-CFTR demonstrou uma transdução eficiente, cerca de 70-90%. Para comprovar a eficácia da transdução, através de uma técnica de imunofluorescência, visualizou-se que as células que sofreram a transdução também expressavam o gene CFTR (Guggino & Cebotaru, 2017).

Entretanto, decorreu outro estudo em coelhos, com administração de vetores VAA-CFTR nos seus brônquios. O vetor VAA-CFTR continha apenas uma parte da sequência CFTR e um oligonucleótido no final da extremidade 5', por isso a proteína produzida apesar de funcional, não era igual à *wild-type* (Guggino & Cebotaru, 2017).

Assim, foi desenvolvido um anticorpo que serviu para verificar a eficiência da transdução desta sequência alterada em células epiteliais humanas de um indivíduo com FC, e esta sequência, mesmo alterada, provou corrigir na totalidade o defeito da sequência CFTR das células humanas. Por fim, o ARN-CFTR e as respetivas proteínas CFTR funcionais também foram encontradas ainda seis meses após a administração (Guggino & Cebotaru, 2017).

Posteriormente foi realizado um estudo em macacos, em que se efetuou uma administração brônquica de uma única dose de vetor VAA-CFTR. Este vetor continha uma sequência completa de CFTR entre duas ITRs, e ainda um promotor intrínseco que permitiu um *packaging* eficiente, com a integração total da sequência CFTR (Guggino & Cebotaru, 2017).

Foram administradas doses diferentes, mas apenas nos macacos que foram submetidos a administrações de  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^{11}$  partículas, foi possível detetar o vetor VAA-CFTR. Por fim, após a infeção, permaneciam-se ausentes sinais de inflamação ou outra toxicidade, e a expressão genética ainda se mantinha detetável ao fim de seis meses (Guggino & Cebotaru, 2017).

#### 3.4.1 b) Ensaios Clínicos

Em 2002, devido aos bons resultados obtidos num ensaio clínico de fase I, passou-se à fase II com um ensaio clínico randomizado, duplo-cego com grupo placebo de controlo. O vetor VAA-CFTR utilizado continha um ADNc CFTR inteiro. Ao fim de três meses de *follow-up* notaram-se algumas recaídas de sinusite, e as diferenças entre o grupo placebo e o grupo que recebeu tratamento não foram significativas o suficiente para provar a eficácia da terapêutica. No entanto, não foram notificados eventos adversos relacionados com a administração do vetor, o que confirma novamente a segurança da utilização dos vetores VAA. Apesar disso, os resultados deste ensaio clínico desapontaram, pois demonstraram uma transdução ineficiente, o que não comprova a eficácia desta técnica (Wagner et al., 2002).

Em 2003 foi realizado o primeiro ensaio clínico de fase I de administração de vetores VAA com a sequência CFTR completa, nos pulmões de 25 indivíduos com FC de fenótipo suave a moderado. Foram administradas  $6 \times 10^4$  a  $2 \times 10^{12}$  partículas resistentes à desoxirribonuclease (DNase), por via intranasal e endobronquial. A administração endobronquial foi realizada por broncoscopia, que conduz as doses endobronquiais de vetor VAA ao segmento bronco pulmonar desejado (Flotte et al., 2003).

Alguns eventos adversos foram notificados provavelmente devido ao procedimento de broncoscopia, pois nenhum estava relacionado com a administração do próprio vetor, no entanto, alguns dos doentes que receberam as doses mais elevadas desenvolveram anticorpos contra a cápside do VAA (Flotte et al., 2003; Guggino & Cebotaru, 2017).

Por fim foi realizado um quarto ensaio clínico de fase I, em que o vetor foi administrado por nebulização aos pulmões de indivíduos com FC. As doses foram tituladas em 12 doentes, de  $10^{10}$  a  $10^{13}$  partículas resistências à DNase, e realizadas broncoscopias ao longo do estudo. Ao fim de 14 e 30 dias, os vetores encontravam-se detetáveis, no entanto, ao fim de 90 dias, os valores já tinham descido para níveis indetetáveis (Guggino & Cebotaru, 2017). A segurança destes vetores mantém-se inquestionável.

### 3.4.2 – Vetores Lipoplexos

#### *3.4.2 a) Ensaio Clínicos*

Em 2015, decorreu um ensaio clínico de fase II, randomizado, duplo-cego, com grupo placebo de controlo. Selecionaram-se 140 indivíduos com FC, >12 anos, com FEV<sub>1</sub> entre 50 e 90% e sem distinção entre mutações CFTR. Dos doentes incluídos neste ensaio, 78 foram submetidos a nebulização de um lipoplexo denominado pGM169/GL67A, e 62 a placebo (Alton et al., 2015).

O complexo pGM169/GL67A para nebulização (5mL) contém 13,3mg de plasmídeo ADN que codifica a sequência CFTR, desprovido de dinucleótidos CpG e 75mg de GL67A, uma mistura lipídica com lípidos catiónicos GL67, e dois outros componentes que facilitam os processos de nebulização e endocitose, DOPE e DMPE-PEG5000 (Alton et al., 2015, 2016).

Este ensaio teve a duração de 12 meses, cada nebulização com 28 dias de intervalo, e para avaliar os *outcomes* foram analisadas a mudança na % do FEV<sub>1</sub> e as melhorias na função e exacerbações pulmonares (Alton et al., 2015).

No *follow-up* do ensaio detetaram-se melhorias significativas na função pulmonar e nas exacerbações ( $p>0,05$ ) e ainda um aumento no FEV<sub>1</sub> de 5%, e conseguinte estabilização do mesmo, em vez de contínua melhora, o que faz com que sejam necessários novos estudos. Contudo não foram notadas diferenças entre indivíduos de sexos, idades e portadores de mutações diferentes, tal como também não foram notificados eventos adversos relacionados com o pGM169/GL67A, o prova a segurança da utilização destes vetores (Alton et al., 2015).

### 3.4.3 – Técnicas de Edição Genética com Base em CRISPR/Cas9

Recentemente, foi estudada a infecção de células estaminais pluripotentes, por um vetor Cas9 guiado por um ARNg-CFTR e um vetor com a sequência CFTR a integrar com a ajuda do sistema *piggyBac* transposase (Firth et al., 2015).

Passadas 48h da infecção das células, estas foram tratadas com puromicina, para serem analisadas. As células resistentes à puromicina, sofreram dissociação por tripsina (enzima proteolítica) e centrifugação. Para que fosse possível analisar a integração das sequência CFTR corretas, procederam ao isolamento e amplificação do ADN por *polymerase chain reaction* (PCR), utilizando um *primer* correspondente à sequência em estudo. Com isto, demonstraram que 16,7% das células infetadas e resistentes à puromicina continham a sequência corrigida e no locus correto. Ainda assim, também confirmaram por sequenciação de ADN que a integração e localização correta da sequência CFTR se encontrava em pelo menos 1 alelo do gene CFTR (Firth et al., 2015).

Por fim, todas as células estaminais pluripotentes resultantes deste estudo, que contêm o gene corrigido e resistentes à puromicina, conseguiram diferenciar-se em endoderme definitiva e consequentemente sofrer maturação em células epiteliais do pulmão, ao fim de 48h (Firth et al., 2014, 2015).

### 3.4.4 – Técnicas de Edição Genética com Base em ZFN

Em 2015 foi realizado um estudo em células estaminais pluripotentes induzidas a partir de fibroblastos de doentes com FC, heterozigóticas para as mutações Phe508del e Ile507del. De um modo geral, esta estratégia passou pela correção do exão 10 mutado, do gene CFTR, por cotransferência de ZFN específicas para CFTR (ZFN-CFTR) e uma sequência CFTR *wild-type* doada (Crane et al., 2015).

As ZFN foram desenvolvidas com base no reconhecimento de sequências ADN que abrangessem 110pb para além do *locus* das mutações, para correção por recombinação homóloga. Após a cotransferência, as células foram tratadas com puromicina e, tal como na técnica CRISPR/Cas9 referida no ponto 3.4.3, as resistentes foram submetidas a PCR e sequenciação de ADN, de modo a confirmar a correção do exão 10 do gene CFTR (Crane et al., 2015).

Através do método Southern Blot confirmaram que quatro clones apresentavam a configuração genômica esperada, contudo, após a sequenciação desses clones, verificou-se que a mutação Phe508del não sofreu nenhuma alteração, mas a mutação Ile507del foi totalmente corrigida em cada alelo em que estava presente, de cada clone (Crane et al., 2015).

Por fim, através do método Western Blot detetaram-se proteínas CFTR e por câmara de Ussing e técnicas experimentais de efluxo de iões, ficou demonstrado que a expressão do gene CFTR corrigido resultou em proteínas CFTR maduras e respetivos canais CFTR funcionais (Crane et al., 2015).





## Capítulo IV - Conclusão

Até há poucos anos atrás, a FC era uma doença apenas compensada com a utilização de medicamentos comumente conhecidos, como antibióticos, vacinas profiláticas, broncodilatadores, enzimas pancreáticas e técnicas de drenagem das secreções brônquicas ou oxigenoterapia em casos mais graves, ou seja, a terapêutica aplicada a esta doença tinha por base apenas a prevenção e controlo das manifestações clínicas (NICE, 2017).

Nos últimos anos a FC tem sido o foco de terapêuticas alternativas, como moduladores da doença ou até mesmo terapia genética. Os moduladores, como o ivacaftor, lumacaftor/ivacaftor, atalureno e tezacaftor/ivacaftor, vieram aumentar a esperança de inúmeros doentes, compensando os defeitos causados na proteína CFTR. No entanto, estes apenas atuam em portadores de determinadas mutações. Por isso, o interesse na terapia genética, aplicada à FC, aumentou por ser uma doença autossômica recessiva, teoricamente de fácil correção, e sem alternativas terapêuticas satisfatórias (Bhandari et al., 2018; Hubert et al., 2016).

Contudo, na prática a FC não é uma patologia fácil para aplicação de terapias genéticas. Os problemas que envolvem as vias respiratórias aumentam a dificuldade da sua aplicação, tanto como as próprias barreiras nos processos celulares e respostas imunes do sistema imunitário do hospedeiro (Burney & Davies, 2012).

Até hoje, foram realizados alguns estudos com base em vetores virais e não virais, e também com base em técnicas de edição genética. A segurança é uma característica comprovada por muitos desses estudos, no entanto, os resultados de eficácia ficaram aquém do que era esperado, e por isso são necessárias novas investigações para alcançar novos resultados positivos no âmbito da eficácia destas técnicas (Alton et al., 2015; Crane et al., 2015; Firth et al., 2015).

No futuro, espera-se conseguir mais e melhores opções terapêuticas, com o desenvolvimento de moduladores mais potentes e o sucesso nas técnicas de edição genética, com segurança e eficácia, de modo a conseguir alcançar a cura de doenças monogénicas, como a FC (Carter & Mckone, 2016; Fajac & De Boeck, 2016). O desenvolvimento da técnica de edição genética com base em CRISPR/Cas9 aplicada à FC abriu novas portas e é a mais recente esperança no âmbito da terapia genética aplicada à FC (Hart & Harrison, 2017).



## Capítulo V - Bibliografia

- Abrunheiro, & Vasco. (2016). *Produção e purificação de vetores virais adeno-associados para terapia génica*. Universidade de Coimbra. [Consultado a 6 de Setembro de 2018] Disponível em [https://eg.uc.pt/bitstream/10316/40905/1/M\\_Vasco\\_Abrunheiro.pdf](https://eg.uc.pt/bitstream/10316/40905/1/M_Vasco_Abrunheiro.pdf)
- Agirre, M., Zarate, J., Ojeda, E., Puras, G., Desbrieres, J., Pedraz, J., ... Pedraz, J. L. (2014). Low Molecular Weight Chitosan (LMWC)-based Polyplexes for pDNA Delivery: From Bench to Bedside. *Polymers*, 6(6), 1727–1755. doi: 10.3390/polym6061727
- Agrotis, A., & Ketteler, R. (2015). A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Frontiers in Genetics*, 6, 300. doi: 10.3389/fgene.2015.00300
- Alton, E., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V, ... Wolstenholme-Hogg, P. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00245-3
- Alton, E., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V, ... Wolstenholme-Hogg, P. (2016). A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis. *Efficacy and Mechanism Evaluation*, 3(5), 1–210. doi: 10.3310/eme03050
- ANFQ. (2012). O que é a Fibrose Quística? [Consultado a 11 de Março de 2018] Disponível em [http://www.apfq.pt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=94&Itemid=105](http://www.apfq.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=105)
- Balajthy, Z., Aradi, J., Csósz, É., Scholtz, B., Szatmári, I., Tózsér, J., & Varga, T. (2011). *Molecular Therapies*. [Consultado a 7 de Setembro de 2018] Disponível em [https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011\\_1A\\_Molekularis\\_terapiak\\_en\\_book/ch03s02.html](https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_en_book/ch03s02.html)
- Barry, P. J., Donaldson, A. L., & Jones, A. M. (2018). Ivacaftor for cystic fibrosis, 1783(May), 1–7. doi: 10.1136/bmj.k1783
- Becq, F., Mall, M. A., Sheppard, D. N., Conese, M., & Zegarra-Moran, O. (2011). Pharmacological therapy for cystic fibrosis: From bench to bedside. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(SUPPL. 2), S129–S145. doi: 10.1016/S1569-1993(11)60018-0
- Bhandari, N., Milic, N., Lamichhane, S., Blake, N., & Bhandari, A. (2018). Cystic Fibrosis: An overview with the impact of gene technology. *Asian Journal of Research in Biology*. [Consultado a 4 de Setembro de 2018] Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/326988724\\_CYSTIC\\_FIBROSIS\\_AN\\_OVERVI](https://www.researchgate.net/publication/326988724_CYSTIC_FIBROSIS_AN_OVERVI)

EW\_WITH\_THE\_IMPACT\_OF\_GENE\_TECHNOLOGY

- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y.-G., ... Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 21(1), 289–297. doi: 10.1128/MCB.21.1.289-297.2001
- Burney, T. J., & Davies, J. C. (2012). Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The Application of Clinical Genetics*, 5, 29–36. doi: 10.2147/TACG.S8873
- Cabello, G. M. K. (2011). Avanços da genética na fibrose cística. [Consultado a 10 de Junho de 2018] Disponível em [http://revista.hupe.uerj.br/detalhe\\_artigo.asp?id=71](http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=71)
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, 188(4), 773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
- Carter, S. C., & Mckone, E. F. (2016). Pharmacogenetics of cystic fibrosis treatment. doi: 10.2217/pgs.16.25
- Carvalho, A. C. (2010). *Construção e caracterização de um vírus Adeno-associado com expressão direccionada para células em divisão*. [Consultado a 5 de Setembro de 2018] Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-18062010-125910/pt-br.php>
- Castellani, C., & Assael, B. M. (2016). Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(1), 129–140. doi: 10.1007/s00018-016-2393-9
- Castellani, C., Southern, K. W., Brownlee, K., Dankert Roelse, J., Duff, A., Farrell, M., ... Elborn, S. (2009). European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8(3), 153–73. doi: 10.1016/j.jcf.2009.01.004
- Centre for Genetics Education. (2018). Autosomal Recessive Inheritance. [Consultado a 26 de Agosto de 2018] Disponível em <http://www.genetics.edu.au/publications-and-resources/facts-sheets/fact-sheet-7-autosomal-recessive-inheritance/view>
- CFTR Science. (2017). Epidemiology: The mutational diversity of cystic fibrosis. [Consultado a 12 de Julho de 2018] Disponível em <https://www.cftrscience.com/?q=epidemiology>
- Chen, L., Tang, L., Xiang, H., Jin, L., Li, Q., Dong, Y., ... Zhang, G. (2014). Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *GigaScience*, 3(1), 1–10. doi: 10.1186/2047-217X-3-24
- Condren, M. E., & Bradshaw, M. D. (2013). Ivacaftor: A Novel Gene-Based Therapeutic Approach for Cystic Fibrosis. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 18(1), 8–13. doi: 10.5863/1551-6776-18.1.8
- Crane, A. M., Kramer, P., Bui, J. H., Chung, W. J., Li, X. S., Gonzalez-Garay, M. L., ... Davis, B. R. (2015). Targeted Correction and Restored Function of the CFTR Gene in Cystic

- Fibrosis Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 4, 569–577. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.005
- Cystic Fibrosis Foundation. (s.d.). Newborn Screening for CF. [Consultado a 7 de Agosto de 2018] Disponível em <https://www.cff.org/What-is-CF/Testing/Newborn-Screening-for-CF/>
- Cystic Fibrosis News Today. (s.d.). Cystic Fibrosis Genetics. [Consultado a 24 de Agosto de 2018] Disponível em <https://cysticfibrosisnewstoday.com/cystic-fibrosis-genetics/>
- Dalcin, P., & Silva, F. (2008). Fibrose Cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 34(2), 107–117. [Consultado a 11 de Março de 2018] Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132008000200008&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132008000200008&script=sci_abstract&tlng=pt)
- Davies, J. C., Cunningham, S., Harris, W. T., Lapey, A., Regelman, W. E., Sawicki, G. S., ... Doolan, K. (2016). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): An open-label, single-arm study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(2), 107–115. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00545-7
- Davis, P. B., Yasothan, U., & Kirkpatrick, P. (2012). Ivacaftor. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5), 349–350. doi: 10.1038/nrd3723
- DeWeerd, S. (2016). Developing gene therapy to treat cystic fibrosis: challenges and successes. *The Pharmaceutical Journal*, 1–12. doi: 10.1211/PJ.2016.20201275
- DGS. (2012). Norma nº 031/2012 de 28/12/2012 - Diagnóstico da Fibrose Quística em Idade Pediátrica e no Adulto, 1–13. [Consultado a 13 de Agosto de 2018] Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas.aspx?cachecontrol=1539444869482>
- DGS. (2015). Tratamento e Seguimento em idade pediátrica e no adulto. [Consultado a 26 de Agosto de 2018] Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas.aspx?cachecontrol=1539444869482>
- Doerfler, W. (1996). Medical Microbiology. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8503/>
- Durmowicz, A. G., & Chowdhury, B. A. (2018). Center for Drug Evaluation and Research. [Consultado a 4 de Setembro de 2018] Disponível em [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/210491Orig1s000SumR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210491Orig1s000SumR.pdf)
- Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. *Seminars*, 388(10059), 2519–2531. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6

- Espadinha, A. S. F. (2010). Diagnóstico Laboratorial da Fibrose Cística. [Consultado a 10 de Agosto de 2018] Disponível em [https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/1658/1/DIAGNÓSTICO\\_FIBROSE\\_CISTICA.pdf](https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/1658/1/DIAGNÓSTICO_FIBROSE_CISTICA.pdf)
- European Medicines Agency. (2015). Kalydeco - ivacaftor, 44, 0–3. [Consultado a 1 de Setembro de 2018] Disponível em [https://www.ema.europa.eu/documents/variation-report/kalydeco-h-c-2494-x-0034-g-epar-assessment-report-extension\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/variation-report/kalydeco-h-c-2494-x-0034-g-epar-assessment-report-extension_en.pdf)
- European Medicines Agency. (2017). Orkambi - lumacaftor/ivacaftor, 44(0), 5–7. [Consultado a 1 de Setembro de 2018] Disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/003954/WC500197614.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003954/WC500197614.pdf)
- European Medicines Agency. (2018). Translarna - Ataluren, 44(0). [Consultado a 3 de Setembro de 2018] Disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002720/WC500171815.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002720/WC500171815.pdf)
- Fajac, I., & De Boeck, K. (2016). New horizons for cystic fibrosis treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.009
- Firth, A. L., Dargitz, C. T., Qualls, S. J., Menon, T., Wright, R., Singer, O., ... Verma, I. M. (2014). Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. doi: 10.1073/pnas.1403470111
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., ... Verma, I. M. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated From Patient iPSCs. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
- Flotte, T. R., Zeitlin, P. L., Reynolds, T. C., Heald, A. E., Pedersen, P., Beck, S., ... Guggino, W. B. (2003). Phase I Trial of Intranasal and Endobronchial Administration of a Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 2 (rAAV2)-CFTR Vector in Adult Cystic Fibrosis Patients: A Two-Part Clinical Study. *Human Gene Therapy*, 14(11), 1079–1088. doi: 10.1089/104303403322124792
- Gallati, S. (2003). Genetics of cystic fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 24(6), 629–638. doi: 10.1055/s-0029-1238911.
- Geiger, J., Aneja, M. K., & Rudolph, C. (2009). Vectors for pulmonary gene therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.010
- Gelfond, D., & Borowitz, D. (2013). Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(4), 333–342. doi: 10.1016/j.cgh.2012.11.006
- Gene Therapy Review. (2008). Retroviral Vector. [Consultado a 6 de Setembro de 2018] Disponível em <http://www.genetherapyreview.com/gene-transfer/retroviral-vector>

- Ginn, S. L., Amaya, A. K., Abedi, M. R., Alexander, I. E., & Edelstein, M. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017 : An update, 1–16. doi: 10.1002/jgm.3015
- Glorioso, J. C. (2014). Herpes Simplex Viral Vectors: Late Bloomers with Big Potential. *Human Gene Therapy*, 25(2), 83–91. doi: 10.1089/hum.2014.2501
- Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. de M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (São Paulo)*, 15(3), 369–375. doi: 10.1590/s1679-45082017rb4024
- Guggino, W. B., & Cebotaru, L. (2017). AAV gene therapy for cystic fibrosis: current barriers and recent developments. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(10), 1265–1273. doi: 10.1080/14712598.2017.1347630.AAV
- Händel, E.-M., Alwin, S., & Cathomen, T. (2009). Expanding or Restrictin the Target Site Repertoire of Zinc-finger Nucleases: The Inter-domain Linker as a Major Determinant of Target Site Selectivity. doi: 10.1038/mt.2008.233
- Hart, S. L., & Harrison, P. T. (2017). Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Human Molecular Genetics*, 34. doi: 10.1093/hmg/ddr104
- Hubert, D., Bui, S., Marguet, C., Colomb-Jung, V., Murris-Espin, M., Corvol, H., & Munck, A. (2016). Nouvelles thérapeutiques de la mucoviscidose ciblant le gène ou la protéine CFTR. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 33(8), 658–665. doi: 10.1016/j.rmr.2015.11.010
- Kay, M. A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: The road ahead. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 316–328. doi: 10.1038/nrg2971
- Kerem, E., Konstan, M. W., De Boeck, K., Accurso, F. J., Sermet-Gaudelus, I., Wilschanski, M., ... Rowe, S. M. (2014). Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(7), 539–547. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70100-6
- Lachmann, R. H. (2004). Herpes simplex virus-based vectors. *International Journal of Experimental Pathology*, 85(4), 177–190. doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.00383.x
- Lister Hill National Center for Biomedical Communications. (2018). CFTR gene - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *U.S. National Library of Medicine, Department of Health & Human Services*, 1–6. Disponível em <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR>
- Lund-Palau, H., Turnbull, A. R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O., ... Davies, J. C. (2016). Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 10(6), 685–697. doi: 10.1080/17476348.2016.1177460
- McCray, P. B. (2001). Difficulties of gene therapy. *The Lancet*, 52242–52242. [Consultado a 27 de Setembro de 2018] Disponível em [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(01\)07032-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(01)07032-5/fulltext)

- Molinski, S. V., Shahani, V. M., Subramanian, A. S., Mackinnon, S. S., Woollard, G., Laforet, M., ... Windemuth, A. (2018). Comprehensive mapping of cystic fibrosis mutations to CFTR protein identifies mutation clusters and molecular docking predicts corrector binding site. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. doi: 10.1002/prot.25496
- Montier, T., Delépine, P., Pichon, C., Férec, C., Porteous, D. J., & Midoux, P. (2004). Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: Progress and challenges. *Trends in Biotechnology*, 22(11), 586–592. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.09.009
- Nemudryi, A. A., Valetdinova, K. R., Medvedev, S. P., & Zakian, S. M. (2014). TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems : Tools of Discovery. *Acta Naturae*, 6(22), 19–40. doi: 10.1007/s11103-014-0188-7
- NICE. (2017). Cystic Fibrosis: Diagnosis and management. [Consultado a 7 de Agosto de 2018] Disponível em <https://www.nice.org.uk/guidance/ng78/chapter/Recommendations>
- Noel, S., Schmidt, B. Z., Haaf, J., & Leal, T. (2016). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis: current perspectives. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications, Volume 8*, 127–140. doi: 10.2147/CPAA.S100759
- Nygårdas, M. (2013). *Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Pathogenesis and HSV Gene Therapy of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. [Consultado a 7 de Setembro de 2018] Disponível em <https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/90617/AnnalesD1077Nygardas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Paranjape, S. M., & Mogayzel, P. J. (2014). Cystic Fibrosis. *Pediatrics in Review*, 35(5), 194–205. doi: 10.1542/pir.35-5-194
- Parker, A. L., Newman, C., Briggs, S., Seymour, L., & Sheridan, P. J. (2003). Nonviral gene delivery: Techniques and implications for molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(22). doi: 10.1017/S1462399403006562
- Paul-Smith, M. C., Bell, R. V., Alton, W. E., Alton, E. W. F. W., & Griesenbach, U. (2016). Gene therapy for cystic fibrosis: recent progress and current aims. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 4(6), 649–658. doi: 10.1080/21678707.2016.1180974
- Robbins, P., & Ghivizzani, S. (1998). Viral Vectors for Gene Therapy. *Elsevier Science Inc.*, 80(1), 35–47. doi: 10.1385/1592593046
- Rowntree, R., & Harris, A. (2003). The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics*, 67(5), 471–485. [Consultado a 7 de Agosto de 2018] Disponível em [http://dordt.worldcat.org/title/the-phenotypic-consequences-of-icftri-mutations/oclc/5153496957&referer=brief\\_results](http://dordt.worldcat.org/title/the-phenotypic-consequences-of-icftri-mutations/oclc/5153496957&referer=brief_results)



- Shoseyov, D., Cohen-Cymberknoh, M., & Wilschanski, M. (2018). Tezacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 10(4), 387–391. doi: 10.1586/17476348.2016.1150181
- Simone, B., Martínez-Gálvez, G., WareJoncas, Z., & Ekker, S. (2018). Fishing for understanding: Unlocking the zebrafish gene editor's toolbox. *Methods*. doi: 10.1016/j.ymeth.2018.07.012
- Sinn, P. L., Anthony, R. M., & McCray, P. B. (2011). Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Human Molecular Genetics*, 20(1), 79–86. doi: 10.1093/hmg/ddr104
- Teixeira, M. R. C. (2007). *Frequência da mutação F508del no gene CFTR na população portuguesa*. [Consultado a 24 de Agosto de 2018] Disponível em <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/7140>
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 346–358. doi: 10.1038/nrg1066
- University of Cincinnati. (2014). *Lentiviral vectors*. [Consultado a 6 de Setembro de 2018] Disponível em [http://www.ehs.ucsb.edu/files/docs/bs/Lentiviral\\_Vectors\\_University\\_of\\_Cincinnati-March2014.pdf](http://www.ehs.ucsb.edu/files/docs/bs/Lentiviral_Vectors_University_of_Cincinnati-March2014.pdf)
- US Department of Health & Human Services. (2018). What is gene therapy? [Consultado a 11 de Março de 2018] Disponível em <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/genetherapy>
- Vankeerberghen, A., Cuppens, H., & Cassiman, J. J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: An intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis*, 1(1), 13–29. doi: 10.1016/S1569-1993(01)00003-0
- Vertex. (2018a). KALYDECO® (ivacaftor). [Consultado a 1 de Setembro de 2018] Disponível em <https://www.kalydeco.com/>
- Vertex. (2018b). ORKAMBI® (lumacaftor/ivacaftor). [Consultado a 1 de Setembro de 2018] Disponível em <https://www.orkambi.com/>
- Vertex. (2018c). SYMDEKO® (tezacaftor/ivacaftor). [Consultado a 4 de Setembro de 2018] Disponível em <https://www.symdeko.com/>
- Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2017). Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(7), 1071–1081. doi: 10.1080/03639045.2017.1298122
- Volpers, C., & Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), S164–S171. doi: 10.1002/jgm.496

- Wagner, J. A., Nepomuceno, I. B., Messner, A. H., Moran, M. L., Batson, E. P., Dimiceli, S., ... Gardner, P. (2002). A Phase II, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of tgAAVCF Using Maxillary Sinus Delivery in Patients with Cystic Fibrosis with Antrostomies. *Human Gene Therapy*, 13(11), 1349–1359. doi: 10.1089/104303402760128577
- Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H., & Sheppard, D. N. (2014). Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 52, 47–57. doi: 10.1016/j.biocel.2014.04.001
- WHO. (2002). The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. [Consultado a 10 de Agosto de 2018] Disponível em <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68702>
- Witt, H. (2003). Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut*, 52 Suppl 2, ii31–41. doi: 10.1136/GUT.52.SUPPL\_2.II31
- Wolfe, S. A., Nekludova, L., & Pabo, C. O. (1999). DNA Recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 183–212. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.183
- Wu, T. L., & Ertl, H. C. J. (2008). Immune barriers to successful gene therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 15(1), 32–39. doi: 10.1016/j.molmed.2008.11.005
- Zainal Abidin, N., Haq, I. J., Gardner, A. I., & Brodlie, M. (2017). Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(13), 1363–1371. doi: 10.1080/14656566.2017.1359255